

高次脳機能制御機構における
ジアシルグリセロールキナーゼ β の行動薬理学的研究

石坂 光絵

目 次

序論	1 頁
第 1 章 DGK β 欠損マウスの躁病様表現型に対する双極性障害治療薬の作用	6 頁
1 節 緒言	
2 節 実験材料および方法	
3 節 実験成績	
4 節 考察	
第 2 章 DGK β 欠損マウスの注意欠損多動性障害様行動に対する精神刺激薬の作用	25 頁
1 節 緒言	
2 節 実験材料および方法	
3 節 実験成績	
4 節 考察	
第 3 章 DGK β 欠損マウスの痙攣感受性に関する検討	55 頁
1 節 緒言	
2 節 実験材料および方法	
3 節 実験成績	
4 節 考察	
総括および結論	71 頁
謝辞	74 頁
引用文献	75 頁
略語一覧表	86 頁

序 論

精神疾患とは、外因性あるいは内因性のストレス等による脳の機能的・器質的な障害のことであり、その症状は抑うつ症状、躁状態、認知障害、幻覚、妄想等様々である。その患者数は近年大幅に増加しており、厚生労働省の調査によると、平成23年の時点では精神疾患により医療機関にかかっている患者数は320万人となっており、現在でも増加傾向にある (Fig. 1)。

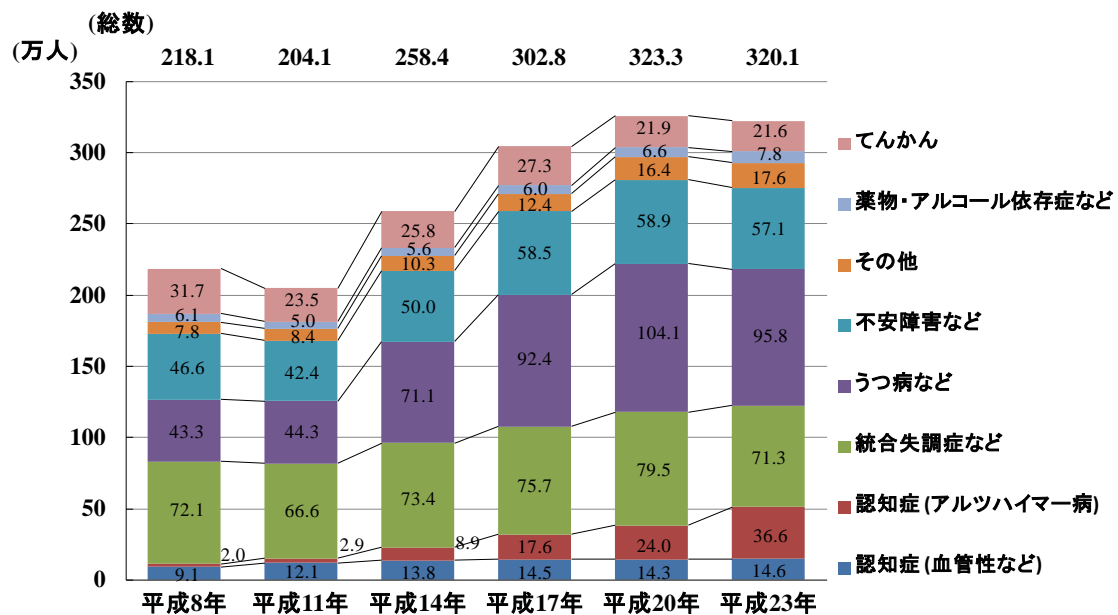


Fig. 1 The number of patients with mental diseases.

Disease classifications of patients presenting to the medical institution.

<http://www.mhlw.go.jp/kokoro/speciality/data.html> より出典

主に精神疾患として分類される疾患には、統合失調症、うつ病や双極性障害に代表される気分障害、不安障害等があるが、その定義にはあいまいな点が多く、てんかんの一部やアルツハイマー病等の精神症状を伴う神経変性疾患も含まれることが多い。いずれの疾患も、環境的な要因や遺伝的な要因が複雑に影響しており、その病態は未だに不明な点が多い。

精神疾患の病態解明に向けた研究は、ヒトにおける臨床研究やマウス、ラット等の動物を用いた研究等、現在においても幅広く行われている。動物を用い

た研究においては、既存の向精神薬を投与しその後の脳内での変化を調べる方法と動物モデルを用いる方法が主に挙げられる。これまでの向精神薬の薬理学的研究により、統合失調症におけるドパミン仮説、グルタミン仮説やうつ病におけるモノアミン仮説等が提唱されているが、病態を完全に再現している仮説や動物モデルが存在しないことから、根本的な治療薬の開発やその病態の本質的な解明は難しいと考えられる。動物モデルを用いた研究においては、適切な動物モデルを確立することが重要となる。精神疾患の動物モデルの確立には、表面妥当性（その疾患の症状とモデル動物で認められる行動上の類似性）、構成妥当性（その疾患に対するモデル動物の構造的類似性）および予測妥当性（その疾患に対する治療薬がモデル動物で効果を示すか否か）の3つを満たすことが必要である（Willner, 1984）。しかしながら、これらの条件を満たすモデル動物を確立すること、またその評価を行うことは困難であり、完全にそれらを満たすモデルは少ない。

Gqタンパク質共役型受容体に成長因子、ホルモン、神経伝達物質等のリガンドが結合すると、ホスホリパーゼC (phospholipase C: PLC) が活性化され、ホスファチジルイノシトール二リン酸 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: PIP₂) からジアシルグリセロール (diacylglycerol: DG) とイノシトール三リン酸 (inositol trisphosphate: IP₃) が産生される (Rhee and Bae, 1997)。DGはプロテインキナーゼC (protein kinase C: PKC) やRasグアニンヌクレオチド放出タンパク質等の機能性タンパク質の活性を調節制御することが知られている (Merida et al., 2008; Nishizuka, 1995)。DGはその後さらにフォスファチジン酸 (phosphatidic acid: PA) へと変換され、PAもラパマイシン標的タンパク質や、ホスファチジルイノシトール4-リン酸5-キナーゼ (phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase: PI₄P5-kinase)、Raf-1 キナーゼ等の機能性タンパク質の活性調節制御を行っている (Ghosh et al.,

1996)。このDGからPAへの変換を担っている酵素がジアシルグリセロールキナーゼ (diacylglycerol kinase: DGK) である (Fig. 2)。それ故、DGKは様々な細胞内シグナルを仲介する鍵となる重要なタンパク質である (Kanoh et al., 1990)。

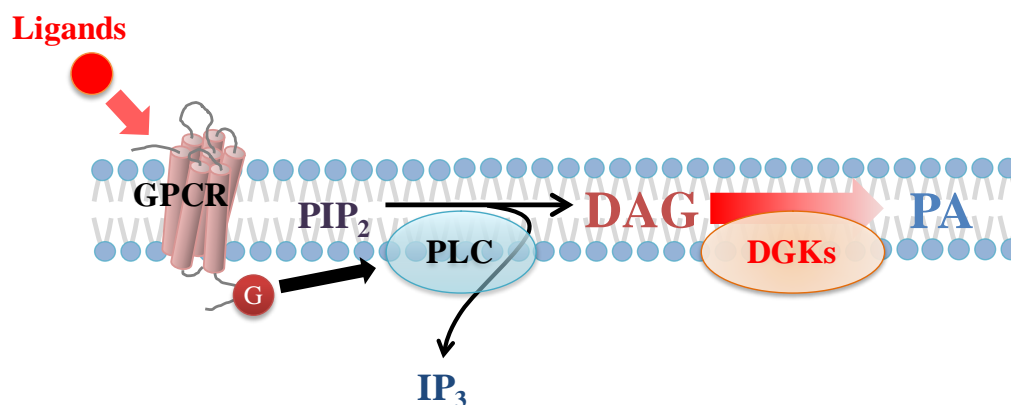


Fig. 2 Gq-protein-coupled receptor downstream signaling.

GPCR : G-protein-coupled receptor、 G : G-protein、 PLC : phospholipase C、
PIP₂ : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate、 IP₃ : inositol 1,4,5-trisphosphate、
DG : diacylglycerol、 DGK : diacylglycerol kinase 、 PA : phosphatidic acid

現在までに、哺乳類においては、10 種類の DGK サブタイプ (α 、 β 、 γ 、 δ 、 η 、 κ 、 ϵ 、 ζ 、 ι 、 θ) が報告されており、すべてのサブタイプは C 末端側に共通の触媒領域を有する (Goto et al., 2007; Sakane et al., 2007; Topham, 2006) (Fig. 3)。

DGK β はタイプ I DGK サブタイプに分類されており、カルシウム結合ドメインである EF-hand とカルシウムセンサーとして働くりカバリンファミリー相同領域 (recoverin homology) を持つためカルシウム依存性を示すことが知られている。DGK ファミリーは脳において豊富に分布しているが、DGK β の発現は神経細胞の細胞表面および細胞骨格に局在しており、とくに皮質、線条体、海馬、嗅球において強く認められ、脳での発現部位はドパミン投射部位と一致している (Goto and Kondo, 1993)。また、線条体の中型有棘ニューロンにおいて、DGK β はドパミン D1、D2 受容体と共発現している (Hozumi et al., 2008)。これらの報

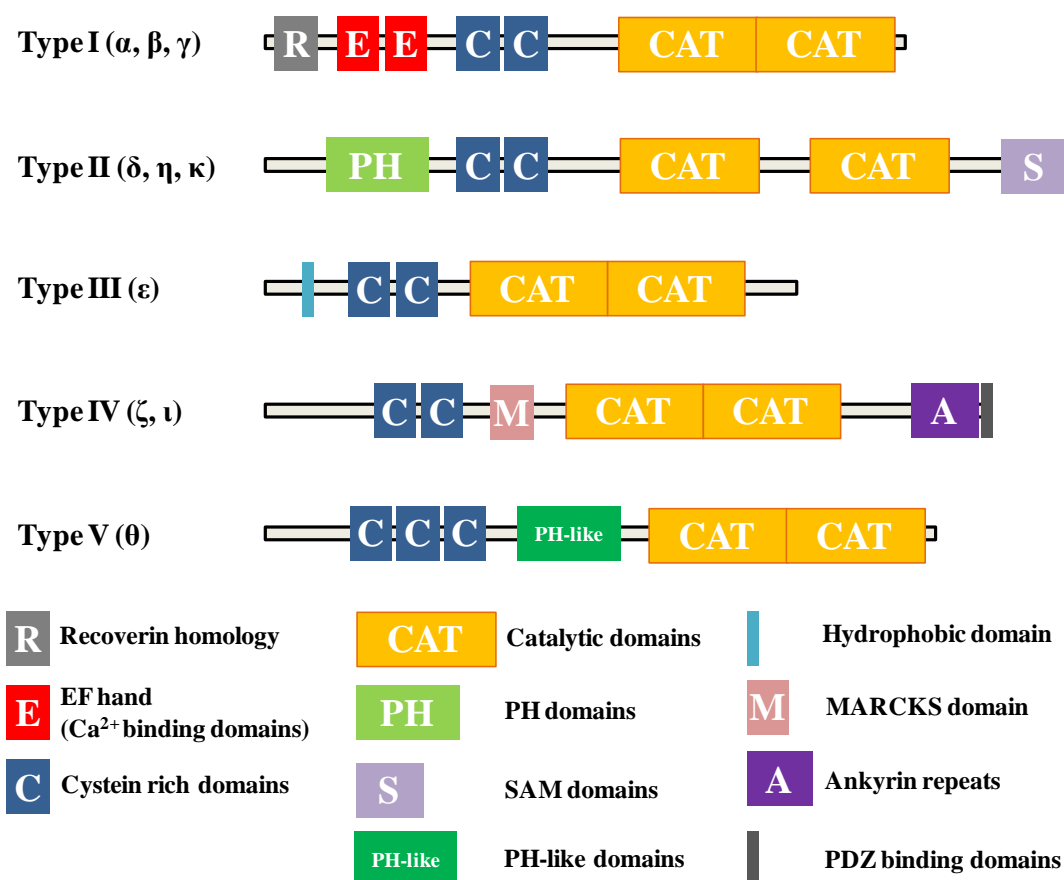


Fig. 3 The structures and classification of DGKs.

DGK isoforms are classified into five types.

PH: pleckstrin homology, MARCKS: myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate

告より、DGK β がドパミン神経伝達において何らかの役割を果たしている可能性が考えられる。

ドパミン神経伝達の機能不全は、パーキンソン病、統合失調症、双極性障害、注意欠損多動性障害 (attention deficit hyperactivity disorder: ADHD)、薬物乱用等に関与していることが知られている。双極性障害患者においては、C 末端が欠損した DGK β のスプライスバリエントが確認されている (Caricasole et al., 2002)。当研究室のこれまでの研究において、DGK β 欠損マウスは躁病様の行動を示し、それらは双極性障害治療薬であるリチウム塩により改善されることを明らかにした (Kakefuda et al., 2010)。また、この DGK β 欠損マウスにおいては、スパイン

形成並びに記憶に障害が認められる (Hozumi et al., 2009; Shirai et al., 2010)。これらの知見より、DGK β は精神疾患や脳高次機能において重要な役割を果たしていることが示唆されている (Caricasole et al., 2002)。

本研究では、DGK β 欠損マウスを用いて、まず第一章ではリチウム塩以外の双極性障害治療薬 (バルプロ酸、オランザピン) の DGK β 欠損マウスの異常行動に対する作用の検討を行った。第二章においては、DGK β 欠損マウスの注意欠損行動の検討および異常行動に対する ADHD 治療薬であるメチルフェニデートの作用の検討を行った。最後に、第三章においては薬物誘発痙攣モデルを用いて、DGK β 欠損マウスの興奮性刺激に対する反応性の検討を行い、高次脳機能における DGK β の役割の解明を試みた。

第 1 章 DGK β 欠損マウスの躁病様表現型に対する双極性障害

治療薬の作用

第 1 節 緒言

双極性障害（躁うつ病）は、躁状態とうつ状態という 2 つの病相の再発を繰り返す疾患である。双極性障害は、躁状態を伴う双極 I 型障害と、軽躁状態を伴う双極 II 型障害に区分されている。生涯罹患率は 1%であり、男女間においてその罹患率に差は認められていない。しかしながら、これまでの双子や養子等を対象とした研究において、双極性障害における遺伝的な要因の関与が示唆されている (Craddock and Jones, 1999)。

治療としては、躁、うつの再発の予防を目的として気分安定薬等による薬物治療が行われている。主な気分安定薬としては、リチウム塩、バルプロ酸が使用されており、非定型抗精神病薬のオランザピン、クエチアピン、アリピプラゾール等においてもその抗躁作用が報告されている。しかしながら、リチウム塩に関しては、その治療域の狭さ、手足の震え、吐き気、めまい等といった副作用の問題もあり、またその他の薬にも様々な副作用が指摘されていることから、より副作用の少ない新規な治療薬の創出が望まれている。

現在までに、双極性障害の特に躁状態のモデル動物作出のために多くの研究がなされている。アンフェタミンやメチルフェニデート等の覚せい剤を正常な動物に投与することで、過活動を始めとする躁病様の行動変化が認められることから、これら薬物の投与により作製された躁病モデルマウスが実験に用いられている (Barbosa et al., 2011; Frey et al., 2006; Machado-Vieira et al., 2004)。また、ウバイン投与による躁病モデル動物等も実験に使用されている (El-Mallakh et al., 2006)。

一方、これまでの臨床における知見に基づき、遺伝子改変動物に着目し、その動物の表現型解析を通じた研究もいくつか行われている。特定の遺伝子の改変により、自発活動量の亢進や不安レベルの変化等が生じることや、その異常行動が既存治療薬で改善されること等が報告されているが (Han et al., 2013; Kirshenbaum et al., 2012; O'Brien et al., 2004; Prickaerts et al., 2006; Roybal et al., 2007)、双極性障害の症状を完全に再現したモデル動物が創出されていないため、さらなる新規の動物モデルの創出が必要である。

DGK β は神経細胞に発現が認められるタンパク質であり、その発現は海馬、皮質等の脳部位において強く認められている (Goto and Kondo, 1993)。双極性障害患者において DGK β の COOH 末端におけるスプライスバリエントが認められたことに基づき (Caricasole et al., 2002)、DGK β 欠損マウスを作製し、その表現型解析を行った。その結果として、DGK β 欠損マウスにおいては自発活動量の亢進、不安レベルの低下、抑うつ行動の減少等の躁病様の表現型が認められることが明らかとなった (Kakefuda et al., 2010)。また、過活動や不安レベルの低下は気分安定薬であるリチウム塩の投与により改善された (Kakefuda et al., 2010)。これらのことから、DGK β 欠損マウスが双極性障害の特に躁状態のモデル動物となりうる可能性が考えられるが、その異常行動に対するリチウム塩の改善作用がリチウム塩特異的なものである可能性も残されている。また、一部の双極性障害患者においては、軽度の認知機能障害も認められており、DGK β 欠損マウスにおいても認知機能の障害が認められている (Shirai et al., 2010)。この DGK β 欠損マウスの認知機能障害が薬物の投与により改善されるか否かについても未だ不明である。

本章では、DGK β 欠損マウスが示す過活動、不安レベルの低下、認知機能の障害が既存の双極性障害治療薬であるバルプロ酸やオランザピンによっても改善

されるかについて、行動試験を用いて検討を行った。

第2節 実験材料および方法

2-1 実験材料

本試験に用いた薬物および試薬は以下の通りである。

バルプロ酸ナトリウム、オランザピン、ドデシル硫酸ナトリウム(sodium dodecyl sulfate: SDS)、酢酸アンモニウム、Proteinase K、エタノールはWako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)、Ethylenedinitrilotetraacetic acid (EDTA) はSigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)、生理食塩水はOtsuka Pharmaceutical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)、1 mM Tris-HCl (pH 8.0)、2-プロパノール、dimaethyl sulfoxide (DMSO)はNacalai Tesque (Kyoto, Japan)よりそれぞれ購入した。

2-2 実験方法

2-2-1 実験動物

C57BL/6N をバックグラウンドとする DGK β 欠損マウスは、*Sleeping Beauty* トランスポゾンシステムによる遺伝子の組み換えにより作出し、その後 9 世代以上のバッククロスを行ったものを使用した (Shirai et al., 2010)。交配はヘテロ欠損マウスを掛け合わせるにより行い、実験には 2-4 ヶ月齢の雄性 DGK β 欠損マウスと同腹仔の野生型マウスを使用した。すべてのマウスは設定温度 24°C (許容範囲: 22-26°C)、設定湿度: 55% (許容範囲: 40-70%)、明暗各 12 時間 (照明: 午前 8:00-午後 8:00)に維持された岐阜薬科大学の動物飼育舎で飼育した。マウスはプラスチック製のケージ (縦 24.5×横 17.5×高さ 12.5 cm)を用い、自由給水下にて固形飼料 (CE-2; CLEA Japan, Tokyo, Japan)により飼育した。行動試験はすべて午前 10:00 から午後 6:00 の間に行った。すべての実験は岐阜薬科大学動物飼

育・動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を受けた上で実施した。
また、遺伝子組換え動物は、岐阜薬科大学・バイオセーフティー委員会に遺伝子組換え実験申請を行い、許可を得て使用した。

2-2-2 マウスのジェノタイピング

生後 4-6 週齢のマウスの尻尾を先端から 2 mm 切り、Cell Lysis Solution (25 mM Tris-HCl pH 8.0、10 mM EDTA pH 8.0、1% SDS) および Proteinase K により溶解した。その後 7.5 M 酢酸アンモニウム溶液によりタンパクを除去し、2-プロパノール、70%エタノールにより DNA を抽出し、PCR を行うことでマウス遺伝子型を同定した。

変異型のアレルを検出する目的で、以下の配列のプライマーを用いた。

Dgk β -PV122-R3: 5'-GAACAGAACAACAATAGCTTATGTTC-3'

T/BAL: 5'-CTTGTGTCATGCACAAAGTAGATGTCC-3'

また、野生型のアレルを検出する目的で以下の配列のプライマーを用いた。

Dgk β -PV122-R3: 5'-GAACAGAACAACAATAGCTTATGTTC-3'

Dgk β -PV122-F3: 5'-TAAGTGGATATTAGCCCAGAACTTAG-3'

増幅反応はTaKaRa PCR Thermal Cycler Dice[®] Gradient (TAKARA BIO INC., Ohtsu, Japan) を用いて 40 サイクル行った。1 サイクルの構成はDNA変性: 95°C 30 秒、アニーリング: 60°C 30 秒、エクステンション: 72°C 1 分間にて行った。

2-2-3 薬物の調製および処置

バルプロ酸ナトリウム (以下、バルプロ酸と略) は生理食塩水に、オランザピンは 1%DMSO 含有生理食塩水に溶解し、実験に使用した。単回処置の実験においては、バルプロ酸 (100 mg/kg)、オランザピン (1 mg/kg)、またはそれらの溶

媒を 10 mL/kg の用量にて腹腔内投与を行った。慢性処置の実験においては、バルプロ酸 (100 mg/kg/day)、オランザピン (1 mg/kg/day)、またはそれらの溶媒を 1 日 1 回、21 日間腹腔内投与を行った。

上記の薬物の投与用量および投与期間の設定は過去の報告を元に行った (Barbosa et al., 2011; Ong et al., 2005; Scotti et al., 2011)。

2-2-4 オープンフィールド試験 (Open field test)

マウスへの薬物投与直後にオープンフィールド試験を既報に従って実施した (Kakefuda et al., 2010)。

オープンフィールド試験には、縦 30×横 30×高さ 30 cm の試験装置を用いて行った (Fig. 4)。薬物投与後速やかにマウスを試験装置内に移し、30 分間マウスの馴化を行った。その後 60 分間のマウスの行動をビデオカメラにより撮影し、Etho Vision XT (Noldus, Wageningen, Netherland) により解析を行った。

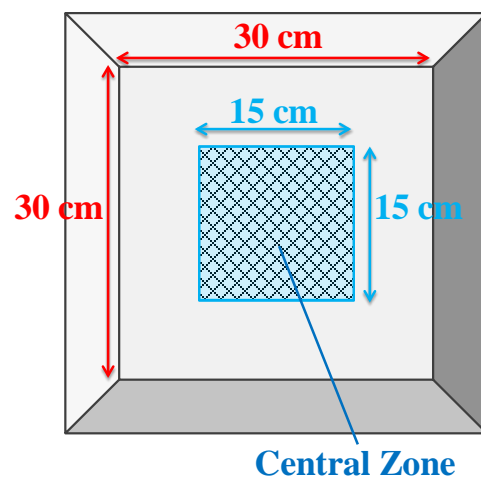


Fig. 4 Illustration of open field chamber.

マウスの自発活動量は、Fig. 4 に示す縦 30×横 30 cm の範囲におけるマウスの移動距離を測定することで算出した。また、不安行動の指標となる中央滞在時間 (duration)、中央侵入回数 (frequency) は、Fig. 4 に示す縦 15×横 15 cm からなる中央部 (Central Zone) 内での滞在時間および侵入回数を自動的に検出することで算出した。

2-2-5 Y字型迷路試験 (Y-maze test)

マウスへ薬物投与を行った 30 分後に Y 字型迷路試験を既報に従い実施した (Oyagi et al., 2009; Shirai et al., 2010)。試験には、プラスチック製の灰色の 3 つのアーム (長さ 40×幅 10×高さ 12 cm) を持つ Y 字型の迷路装置を用いた。あらかじめ指定した 1 本のアームにマウスを置き、8 分間自由に探索させた。その探索行動において、マウスが直前にいたアームに戻ることなく 3 つのアームを順番に探索した場合を正しいアームの選択 (alternation) とした (Fig. 5)。この場合、正しいアームの選択数の最大はマウスがアームに侵入した回数から 2 を引いた数であり、このことからアームの選択率 [alternation (%)] を以下の式により算出した。

$$\text{Alternation (\%)} = (\text{正しいアームの選択数} / \text{最大選択数}) \times 100$$

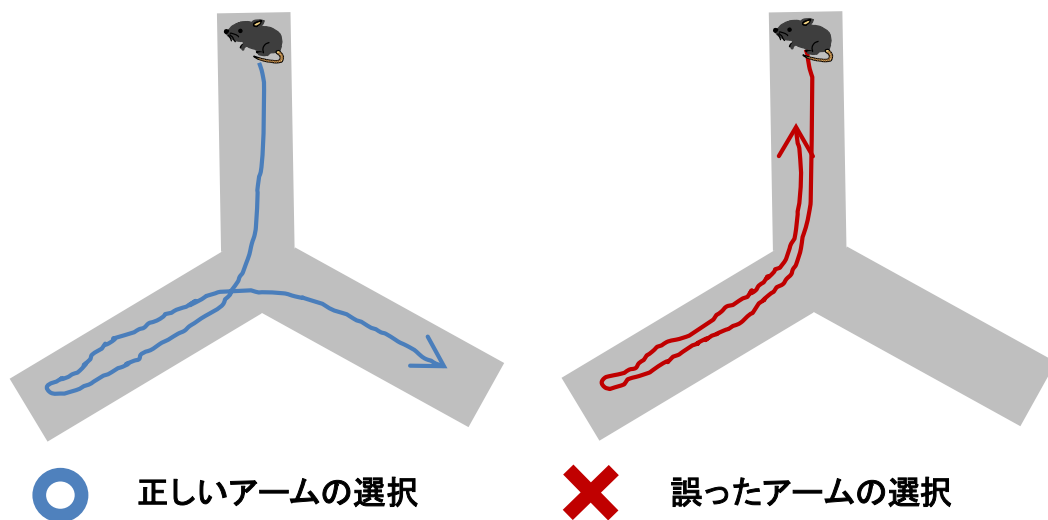


Fig. 5 Illustration of Y-maze test.

2-2-6 統計学的解析

実験成績は平均値 ± 標準誤差 (SEM) で示した。統計学的な解析は JSTAT (Vector, Tokyo, Japan) または Statistical Package for the Social Science 15.0J for Windows software (SPSS Japan Inc., Tokyo, Japan) を用いて行った。遺伝子要因お

よび薬物要因からなる 2 要因の分散分析を行い、その後、Student's t 検定または Dunnett's 検定により統計解析を行った。危険率が 5%未満を有意差有りとした。

第3節 実験成績

3-1 DGK β 欠損マウスの自発活動量に及ぼすバルプロ酸およびオランザピン

単回投与の影響

これまでの検討から、DGK β 欠損マウスは、自発活動量の亢進等を特徴とする躁病様の表現型が認められている (Kakefuda et al., 2010)。本検討においては、バルプロ酸やオランザピンの DGK β 欠損マウスにおける抗躁作用の検討を行うため、まずはじめにこれら薬物の単回投与後の

Single treatment

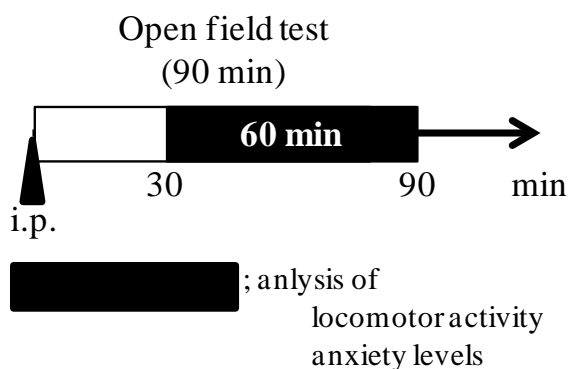


Fig. 6 Outline of the open field test.

Valproate (100 mg/kg) and olanzapine (1 mg/kg) were administered intraperitoneally. After a 30-min habituation period, locomotor activity and anxiety level were measured for 1 h.

DGK β 欠損マウスの行動変化の検討をオープンフィールド試験により行った。マウスの自発活動量は 30 分間の馴化後 60 分間測定した (Fig. 6)。マウスの自発活動量に関して、有意な遺伝子要因 [$F(1,53) = 30.59, p < 0.01$] および薬物要因 [$F(2,53) = 9.91, p < 0.01$] が認められた。DGK β 欠損マウスの自発活動量は、野生型マウスに比べ有意な増加が認められた (Fig. 7)。野生型マウスにおいて、バルプロ酸の単回投与は自発活動量を有意に増加させたが、オランザピンの単回投与は野生型マウスの行動に有意な変化を及ぼさなかった。DGK β 欠損マウスにおいて、バルプロ酸の単回投与は自発活動量に影響を及ぼさなかったが、オランザピンの投与は DGK β 欠損マウスの自発活動量を低下させる傾向を示した ($p = 0.08$)。しかしながら、これら薬物の単回投与の DGK β 欠損マウスへの自発活動量に及ぼす影響はいずれも有意ではなかった。

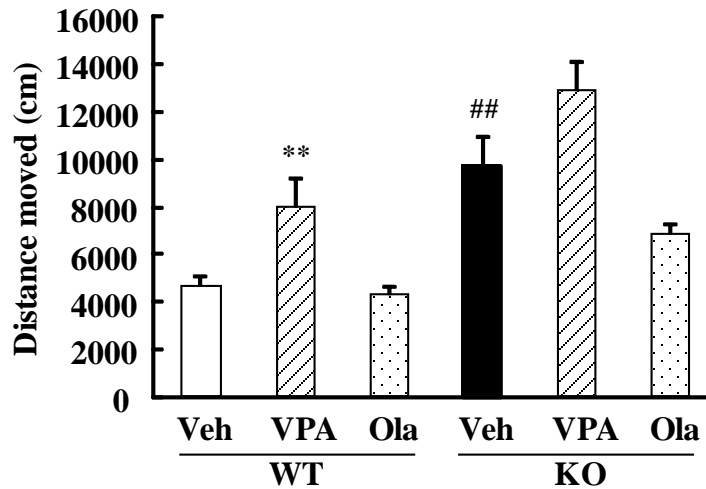


Fig. 7 The effect of single treatment of valproate (VPA) and olanzapine (Ola) on the locomotor activity of WT and DGK β KO mice.

The distance moved during the 1-h duration of open field test. Values are expressed as the mean \pm SEM (n = 5 - 13). ## p < 0.01 vs. vehicle-treated WT mice (Student's t -test). ** p < 0.01 vs. vehicle-treated WT mice (Dunnett's test).

3-2 DGK β 欠損マウスの不安レベルに及ぼすバルプロ酸およびオランザピン単回投与の影響

DGK β 欠損マウスにおいて、自発活動量の亢進に加え、不安レベルの低下様の行動が確認されている (Kakefuda et al., 2010)。そのため、バルプロ酸およびオランザピン単回投与の DGK β 欠損マウスの不安レベルに及ぼす影響を検討した。今回、不安レベルの指標として、オープンフィールド試験における中央滞在時間および中央への侵入回数の二つの指標を用いた。これらの指標は、不安レベルの高いマウスでは減少し、不安レベルの低下したマウスでは増加することがこれまでの報告から明らかとなっており、広く実験に用いられている (Christakis et al., 2012; Kakefuda et al., 2010)。今回の試験では、自発活動量の測定と同様に、60 分間における中央滞在時間および中央への侵入回数の測定を行った。

マウスの中央への侵入回数に関しては、遺伝型、薬物の二要因において、有意な作用が認められた [genotype: $F(1,53) = 16.25$, $p < 0.01$; drugs: $F(2,53) = 3.83$, p

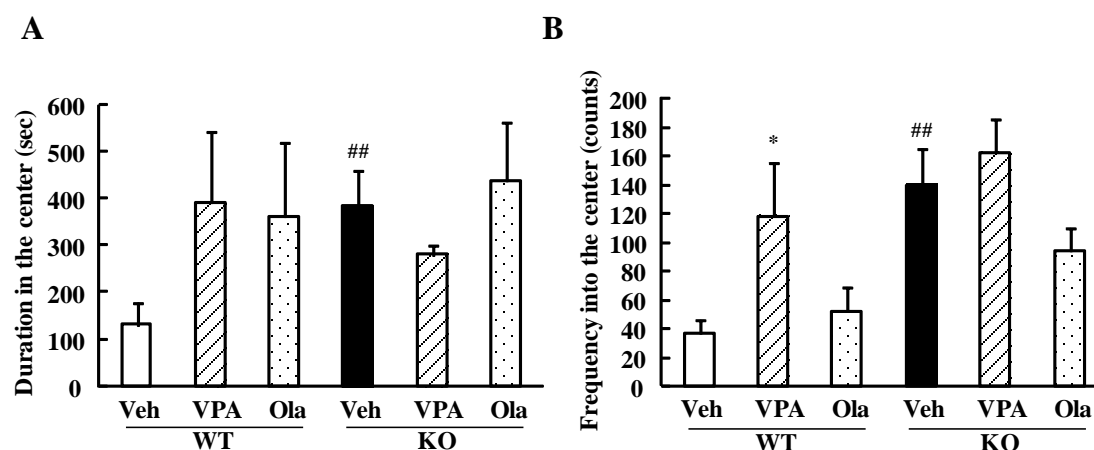


Fig. 8 The effect of single treatment of valproate (VPA) and olanzapine (Ola) on the anxiety levels of WT and DGK β KO mice.

(A) Duration in the central zone, and (B) frequency in the central zone during the 1-h duration of open field test. Values are expressed as the mean \pm SEM ($n = 5 - 13$). ^{##} $p < 0.01$ vs. vehicle-treated WT mice (Student's t -test). ^{*} $p < 0.05$ vs. vehicle-treated WT mice (Dunnett's test).

< 0.05]。DGK β 欠損マウスは、中央滞在時間および中央への侵入回数の両方の指標において野生型マウスに比べ有意な増加が認められた (Fig. 8A, B)。野生型マウスにおいては、バルプロ酸の単回投与により中央への侵入回数において有意な増加が認められた。中央滞在時間に関しては、バルプロ酸およびオランザピンの単回投与は野生型マウスにおいて増加させる傾向が認められたものの、有意な変化ではなかった。DGK β 欠損マウスにおいては、バルプロ酸単回投与により中央滞在時間の減少傾向が認められた ($p = 0.392$)。一方、オランザピンの単回投与は中央への侵入回数の減少傾向が認められた ($p = 0.163$)。しかしながら、これら薬物の単回投与の DGK β 欠損マウスへの不安レベルに及ぼす影響はいずれも有意ではなかった。

薬物の単回投与の実験の結果より、バルプロ酸およびオランザピンの単回投与は DGK β 欠損マウスの異常行動に対して明らかな作用を示さなかった。

3-3 DGK β 欠損マウスの自発活動量に及ぼすバルプロ酸およびオランザピン慢性投与の影響

つぎに、DGK β 欠損マウスの自発活動量に及ぼすバルプロ酸およびオランザピンの慢性投与の影響を検討した。オープンフィールド試験は、薬物投与を開始してから15日目に行った (Fig. 9)。

マウスの自発活動量に関し

Chronic treatment

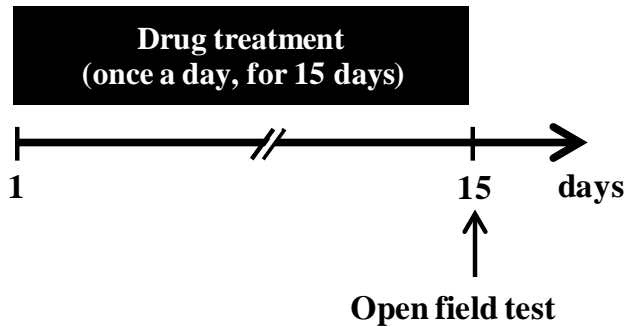


Fig. 9 Flow of the open field test.

Valproate (100 mg/kg/day) and olanzapine (1 mg/kg/day) were administered intraperitoneally once a day for 15 days. On the day 15, open field test was performed.

て、有意な遺伝子要因 [$F(1,103) = 31.47, p < 0.01$] および薬物要因 [$F(2,103) = 9.24, p < 0.01$] の作用が認められた。また、DGK β 欠損マウスで認められた自発活動量の亢進は、バルプロ酸およびオランザピンの慢性投与により有意に改善された (Fig. 10)。オランザピンの慢性投与は、野生型マウスにおいても自発活

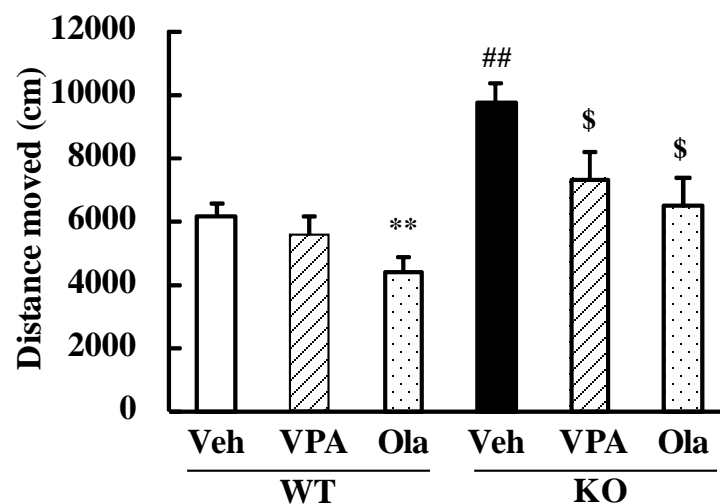


Fig. 10 The effect of chronic treatment of valproate (VPA) and olanzapine (Ola) on the locomotor activity of WT and DGK β KO mice.

The distance moved during the 1-h duration of open field test. Values are expressed as the mean \pm SEM ($n = 10 - 28$). $^{##}p < 0.01$ vs. vehicle-treated WT mice (Student's t -test). $^{**}p < 0.01$ vs. vehicle-treated WT mice, $^{\$}p < 0.05$ vs. vehicle-treated KO mice (Dunnett's test).

動量を有意に減少させたが、バルプロ酸の慢性投与は野生型マウスの自発活動量に影響を及ぼさなかった。

これらの結果より、バルプロ酸およびオランザピンの慢性投与は、DGK β 欠損マウスにおいて認められる自発活動量の亢進を有意に改善することが明らかとなった。

3-4 DGK β 欠損マウスの不安レベルに及ぼすバルプロ酸およびオランザピン慢性投与の影響

DGK β 欠損マウスの不安レベルに及ぼすバルプロ酸およびオランザピンの慢性投与の影響に関して検討を行った。マウスの中央滞在時間に関しては、有意な遺伝子要因 [$F(1,103) = 4.82, p < 0.05$] および薬物要因 [$F(2,103) = 6.71, p < 0.01$] の主作用が認められた。また、マウスの中央への侵入回数に関しても、有意な遺伝子要因 [$F(1,103) = 15.01, p < 0.01$] および薬物要因 [$F(2,103)=8.77, p < 0.01$] の作用が認められた。DGK β 欠損マウスにおいて認められる中央滞在時間の増加や中央への侵入回数の増大は、バルプロ酸およびオランザピンの慢性投与によって有意に減少した (Fig. 11)。野生型マウスにおいては、自発活動量の結果と同様に、オランザピンの慢性投与は中央滞在時間および中央への侵入回数を減少させたが、バルプロ酸にはそのような影響は認められなかった。

以上の結果より、DGK β 欠損マウスにおいて認められる不安レベルの低下といった異常な行動は、バルプロ酸、オランザピンの慢性投与により有意に改善されることが明らかとなった。

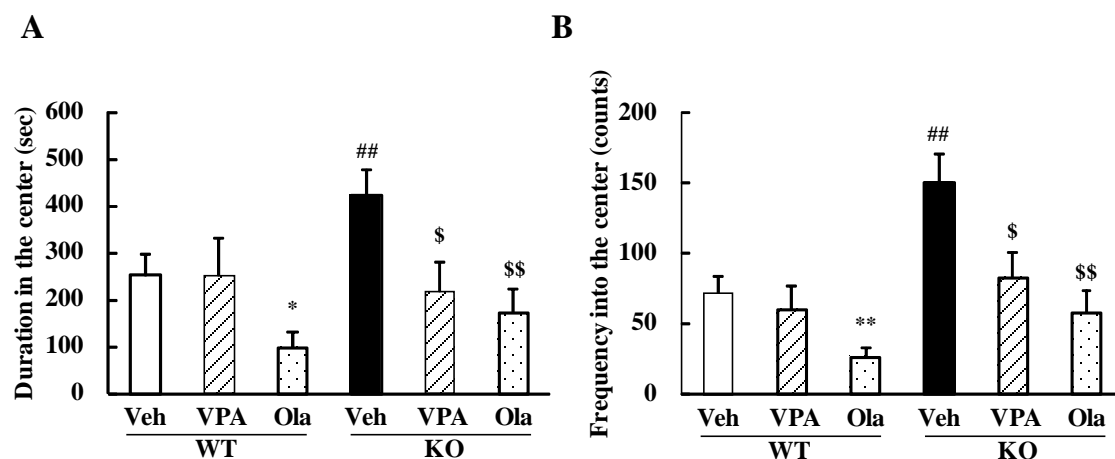


Fig. 11 The effect of chronic treatment of valproate (VPA) and olanzapine (Ola) on the anxiety levels of WT and DGK β KO mice.

(A) Duration in the central zone, and (B) frequency in the central zone during the 1-h duration of open field test. Values are expressed as the mean \pm SEM ($n = 10 - 28$). ## $p < 0.01$ vs. vehicle-treated WT mice (Student's t -test). * $p < 0.05$ vs. vehicle-treated WT mice, \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$ vs. vehicle-treated KO mice (Dunnett's test).

3-5 DGK β 欠損マウスの認知行動に及ぼすバルプロ酸およびオランザピンの慢性投与の影響

これまでの検討において、DGK β 欠損マウスは認知機能に障害が認められることが明らかとなっている (Shirai et al., 2010)。

そのため、本検討においては、バルプロ酸およびオランザピンの慢性投

Chronic treatment

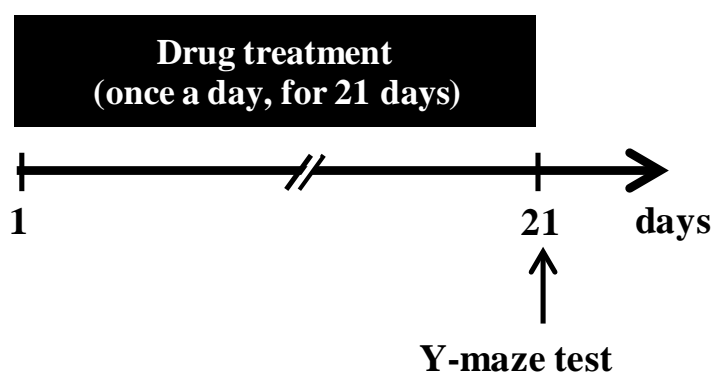


Fig. 12 Flow of the Y-maze test.

Valproate (100 mg/kg/day) and olanzapine (1 mg/kg/day) were administered intraperitoneally once a day for 21 days. On the day 21, Y-maze test was performed.

与が DGK β 欠損マウスの認知機能に及ぼす影響について、Y 字型迷路試験により検討を行った。それぞれの薬物の投与開始から 21 日目に Y 字型迷路試験を実

施した (Fig. 12)。

バルプロ酸処置後の正答率に関しては、有意な遺伝子要因の主効果 [$F(1,29) = 5.03, p < 0.05$] と薬物要因の主効果 [$F(1,29) = 6.41, p < 0.05$] が認められた。過去の報告と同様に、DGK β 欠損マウスにおいては認知機能の低下が認められ、バルプロ酸の慢性投与により改善された (Fig. 13A)。オランザピン慢性処置は、有意

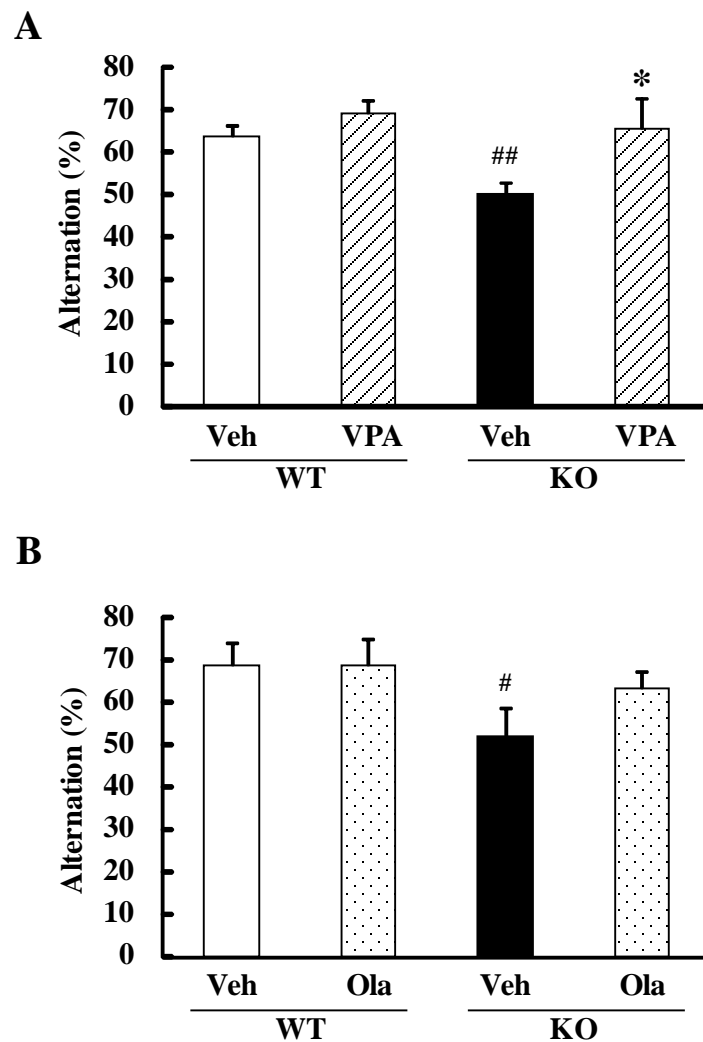


Fig. 13 The effects of chronic treatment of valproate (VPA) and olanzapine (Ola) on the cognitive-deficit of DGK β KO mice.

(A) The effect of valproate on the cognitive function of DGK β KO mice. Values are expressed as the mean \pm SEM. ($n = 6$ to 8). $^{##}p < 0.01$ vs. vehicle-treated WT mice; $^{*}p < 0.05$ vs. vehicle-treated KO mice (Student's t -test). (B) The effect of olanzapine on the cognitive function of DGK β KO mice. Values are expressed as the mean \pm SEM. ($n = 11$ to 15). $^{#}p < 0.05$ vs. vehicle-treated WT mice (Student's t -test).

な遺伝子要因の主作用は認められたものの [$F(1,55) = 4.13, p < 0.05$]、薬物の主作用は認められなかった [$F(1,55) = 1.01, p > 0.05$]。また、オランザピンの慢性投与は、DGK β 欠損マウスの認知機能低下の改善傾向が認められたものの、有意ではなかった ($p = 0.091$) (Fig. 13B)。

これらの結果から、バルプロ酸の慢性処置は DGK β 欠損マウスの認知機能改善に効果を示すことが明らかとなった。

第4節 考察

本研究において、DGK β 欠損マウスにおいて認められる過活動、不安レベルの低下および認知機能の低下等の異常行動は、臨床的に躁病に対して有効であると知られているバルプロ酸やオランザピンによって改善されることが明らかとなった。これらの結果は、DGK β 欠損マウスが躁病モデルマウスとして有用である可能性を示唆するものである。

現在までに、DGK の双極性障害への関与に関してはいくつかの報告がなされている。先に述べたように、DGK β の COOH 末端のスプライスバリエントが双極性障害患者において見い出されており (Caricasole et al., 2002)、筆者らは、DGK β 欠損マウスは過活動を主徴とする行動異常を示すことを明らかにしている (Kakefuda et al., 2010)。また、他のアイソフォームに関しても、双極性障害への関与が示唆されている。Type II に分類される DGK η についてもいくつかの関連報告がなされており、双極性障害患者脳内において、DGK η mRNA 発現量が増大していること、DGK η の SNPs が存在することが、最近明らかにされている (Baum et al., 2008; Ishisaka and Hara, 2014; Moya et al., 2010; Weber et al., 2011)。これらの報告は、DGKs 自身またはその下流シグナルが正常な脳機能の維持に関与している可能性を示唆するものである。実際、DGKs シグナルの下流に存在する Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3)、ホスホイノシトール経路、PKC 等は双極性障害において影響を受けている分子であり、治療ターゲットとしての可能性が示唆されている (Hoertel et al., 2013)。以上、DGK β をはじめとした DGKs の中枢神経系における役割を解明することで、双極性障害の病態解明につながる可能性が考えられる。

これまでの検討において、筆者らは DGK β 欠損マウスにおいて認められる異常行動が双極性障害に有効とされているリチウム塩の投与により改善されるこ

とを明らかにした (Kakefuda et al., 2010)。加えて、定型抗精神病薬であるハロペリドールの効果についても検討を行い、ハロペリドールに関しては DGK β 欠損マウスの過活動や不安レベルには有意な作用を示さないことを明らかにした (Kakefuda et al., 2010)。本研究においては、バルプロ酸およびオランザピンの二種類の薬物を用い、それらの DGK β 欠損マウスの異常行動に対する作用を検討した。バルプロ酸はリチウム塩と同様に双極性障害の躁状態に対して広く用いられており、数々の躁病モデル動物においてもその有効性が示されている (Rezin et al., 2014; Stertz et al., 2013; van Enkhuizen et al., 2013)。その作用機序に関しては不明な点が多いが、神経伝達物質である γ -アミノ酪酸 (γ -aminobutyric acid: GABA) の合成促進作用が抗躁作用の一部であると考えられている。オランザピンは非定型抗精神病薬の一つであり、過活動を示すマウスにおいてその自発活動量に対して効果を示すことが明らかとなっている (Scotti et al., 2011)。オランザピンは、ドパミンやアセチルコリンの放出促進作用を介して抗躁作用を示すことが示唆されている (Huang et al., 2006)。

本研究では、オープンフィールド試験を用いて自発活動量と不安レベルを測定した。オープンフィールド試験における自発活動量の測定は、統合失調症、薬物中毒、自閉症、躁病等多くの疾患モデル動物を用いた検討で使用されている。これまでの検討において、DGK β 欠損マウスの過活動がリチウム塩の処置によって改善されることから、この DGK β 欠損マウスの過活動を躁病様の行動であると仮説を立て、研究を行った。実際、バルプロ酸やオランザピンの慢性投与によって過活動をはじめとする異常行動は改善されたが、これら薬物の単回投与においてはその作用は認められなかった。薬物の慢性投与は、実際の臨床においてのヒトでの使用を考えた際には現実的なものであり、双極性障害等の精神疾患患者においては治療薬を慢性投与して初めてその効果が認められるこ

とが多い。動物を用いた研究においても、躁病モデルマウスとして広く使用されているドパミントランスポーター (dopamine transporter: DAT) 欠損マウスの過活動もバルプロ酸の慢性投与によって改善されることが明らかとなっている (van Enkhuizen et al., 2013)。この点からも、本検討において薬物の単回投与が DGK β 欠損マウスの異常行動に対して効果を示さなかったことが臨床で認められる効果とも相関していると考えられる。以上の事からも、DGK β 欠損マウスは躁病のモデルマウスとして有用性を示唆するものである。

しかしながら、本研究において、オランザピンの慢性投与は DGK β 欠損マウスの行動のみではなく、野生型マウスの行動にも影響を及ぼしている。オランザピンが野生型マウスの基本行動に影響を及ぼす可能性が報告されている (McOmish et al., 2012)。オランザピンが持つ鎮静作用によって今回の結果がもたらされた可能性を否定することはできないが、少なくとも、DGK β 欠損マウスに対してもオランザピンが何らかの作用を示したことが考えられる。

本検討では、バルプロ酸やオランザピンが DGK β 欠損マウスの異常行動を改善することを明らかにしたが、その作用機序は明らかにしていない。しかしながら、Akt-GSK3 β シグナルの改善が関与している可能性が考えられる。これまでの研究において、DGK β 欠損マウスの大脳皮質において Akt-GSK3 β シグナルの低下が認められていることおよびリチウム塩の処置によりこの Akt-GSK3 β シグナルの低下が改善されることを明らかにしている (Kakefuda et al., 2010)。リチウム塩と同様に、バルプロ酸やオランザピンを含む様々な抗精神病薬が Akt-GSK3 β シグナルに作用することが明らかとなっている (Aubry et al., 2009; Li et al., 2002; Sutton and Rushlow, 2011)。他の動物モデルにおける抗精神病薬投与の研究においても、Akt-GSK3 β シグナルの改善が過活動等の行動改善に寄与することが報告されている (Beaulieu et al., 2004; O'Brien et al., 2011;

Salkovic-Petrisic et al., 2006)。しかしながら、本検討においてバルプロ酸やオランザピンがDGK β 欠損マウスの異常行動に効果を示したその作用機序に関しては、更なる研究が必要であると考えられる。

本章においては、バルプロ酸やオランザピン等の実際に臨床において躁病に有効である薬物のDGK β 欠損マウスへの作用を検討し、効果を示すことを明らかにした。これらの結果は、DGK β 欠損マウスの躁病モデルマウスとしての有用性を示唆するものである。

第2章 DGK β 欠損マウスの注意欠損多動性障害様行動に対する 精神刺激薬の作用

第1節 緒言

注意欠損多動性障害 (attention deficit hyperactivity disorder: ADHD) とは、多動性、不注意、衝動性を主な症状とする発達障害もしくは行動障害である。罹病率に関しては諸説あるが、学童期における罹病率は 5%程度とされており、性別による罹病率の比較では、男子：女子=4：1 であり、男子に多く認められることが知られている。ADHD の原因としては、遺伝要因、周産期障害、虐待等、様々な要因が考えられている。また、ADHD を発症した子供および大人においては、他の双極性障害等の精神疾患もともに発症している場合も少なくない (Nierenberg et al., 2005; Reich et al., 2005)。

また、双極性障害、ADHD ともに、多動性を主症状とする疾患である点では共通している (Fig. 14)。動物モデルにおいても、当初は躁病モデル動物として報告されたマウスにおいて、ADHD 治療薬の効果が認められた例も報告されている (Beaulieu et al., 2006)。

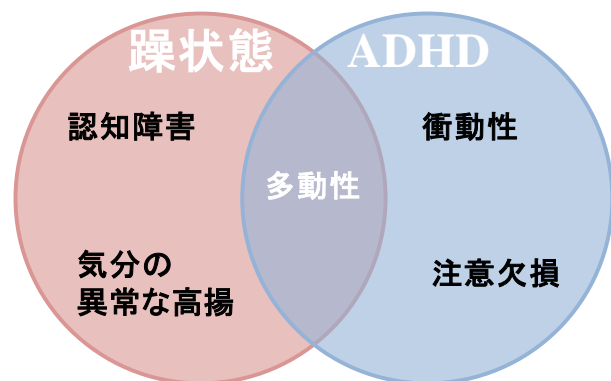


Fig. 14 The prominent symptoms of bipolar disorder and ADHD.

メチルフェニデートは中枢神経刺激薬であり、その作用はドパミントランスポーター (DAT) 阻害によりシナプス間隙におけるドパミン量を増加させることによると考えられている。日本ではリタリン[®] (Ritalin[®]) とコンサータ[®] (Concerta[®]) がメチルフェニデートを含む医薬品として、ADHDやナルコレプシ

一の治療に用いられている。興味深いことに、野生型マウスにメチルフェニデートを投与すると、活動量が増加するが、過活動が認められるDAT欠損マウス、カゼインキナーゼ 1δ欠損マウスおよびp35 欠損マウスにメチルフェニデートを投与すると活動量が減少することが報告されている (Beaulieu et al., 2006; Krapacher et al., 2010; Zhou et al., 2010)。

本研究では、DGKβ 欠損マウスを用いてさらなる表現型解析を目的とし、マウスの注意力および精神刺激薬に対する反応性について検討した。また、線条体におけるドパミンシステムを中心として、DGKβ 欠損が及ぼす影響について検討を行った。

第2節 実験材料および方法

2-1 実験材料

本試験に用いた薬物および試薬は、以下の通りである。

Tris-HCl (pH 8.0)、グリシン (glycine)、Block One-P、リン酸水素二ナトリウム・12水和物 (disodium hydrogenphosphate 12-water: $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、リン酸二水素ナトリウム二水和物 (sodium dihydrogenphosphate dehydrate: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、Triton X-100、ペントバルビタール (pentobarbital) はNacalai Tesque、proteinase K solutionはQiagen、メチルフェニデート (methylphenidate)、酢酸アンモニウム (ammonium acetate)、3,4-dihydroxyphenylethylamine (DA)、3,4-dihydroxyphenyl acetic acid (DOPAC)、5-hydroxytryptamine hydrochloride (5-HT)、5-hydroxy indol-3-acetic acid (5-HIAA)、ハロペリドール (haloperidol)、protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail II、phosphatase inhibitor cocktail III、MK-801、Igepal CA-630 はSigma Aldrich、クエン酸一水和物 (citric acid monohydrate)、無水酢酸ナトリウム (sodium acetate anhydrous)、dl-イソプレテノール塩酸塩

(dl-isopretenol-hydrochloride)、60%過塩素酸溶液 (60% perchloric acid)、diluted water、Sample Buffer Solution (2ME+) (x4)、メタノール (methanol)、イムノスター®LD、デオキシコール酸ナトリウム (sodium deoxycholate)、SDS、パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde : PFA)、スクロース (sucrose)、塩化カリウム (potassium chloride : KCl) はWako Pure Chemical Industries、BCA protein assay kitはThermo Scientific (Waltham, MA, USA)、tris-buffered saline (TBS) はタカラバイオ株式会社、塩化ナトリウム (sodium chloride: NaCl)、水酸化ナトリウム (sodium hydroxide: NaOH) はKishida Chemical (Osaka, Japan)、1-オクタンスルホン酸ナトリウム (sodium octane-1-sulfonate) は東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan)、EDTA・2Na (disodium ethylenediamine tetraacetate) は株式会社同仁化学研究所 (Kumamoto, Japan)、ブロックエース (Block ace) はDainippon Sumitomo Pharma (Osaka, Japan)、O.C.T. compoundはSakura Finetechnical (Tokyo, Japan)、ectastain elite Avidin Biotinylated Enzyme complex (ABC) kit、diaminobenzidine (DAB) peroxidase substrate kitはVector Labs (Burlingame, CA, USA)、EUKITTはO.Kindler (Freiburg, Germany)、Can get signal solution 1、Can get signal solution 2 はToyobo (Osaka, Japan)、トリス塩基 (tris base) はBIO RAD (Hercules, CA, USA) よりそれぞれ購入した。

2-2 実験方法

2-2-1 実験動物

DGK β 欠損マウスおよびその同腹仔である野生型マウスは、第1章で示した動物を使用した。動物は自由給水下にて固形飼料 (CE-2) により飼育し、行動試験はすべて午前 10:00 から午後 6:00 の間に行った。すべての実験は岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を受けた上で実施した。また、遺伝子組換え動物は、岐阜薬科大学・バイオセーフティー委員会

に遺伝子組換え実験申請を行い、許可を得て使用した。

2-2-2 薬物の調製および処置

メチルフェニデート、dizocilpine (MK-801) は生理食塩水に溶解し、実験に使用した。ハロペリドールは 0.3% 酒石酸溶液に溶解し、実験に使用した。メチルフェニデート (0.3、3、30 mg/kg)、MK-801 (0.3 mg/kg)、ハロペリドール (0、0.25、0.5、1.0) またはそれらの溶媒を 10 mL/kg の容量にて腹腔内より投与した。

2-2-3 Object-based attention test



Fig. 15 Illustration of object-based attention test.

試験は Alkam らと同様の方法を用いて行った (Alkam et al., 2011)。試験装置は exploring chamber (縦 30 × 横 30 × 高さ 22 cm) と test chamber (縦 30 × 横 15 × 高さ 22 cm) からなり、それらは取り外し可能な板により仕切った (Fig. 15)。装置の床にはソフトチップ (SLC, Shizuoka, Japan) を敷き詰め、他のマウスの影響を避けるために各マウスごとに 70%エタノールで床を拭きとった後、ソフトチップを新しいものと取り換えた。試験は馴化試行 (habituation phase)、獲得試行 (acquisition phase)、保持試行 (retention phase) の 3 部に分けて行った (Fig. 15)。

馴化試行: 仕切り板を取り除いた状態の装置内にマウスを放ち、10 分間自由に探索行動をさせる。

獲得試行: 仕切り版を設置し、exploring chamber 内に等間隔に木製の積み木を 5 つ (A~E) 設置する。この 5 つの積み木の素材、匂い、色に差はなく、形が異なっている。ここにマウスを放ち、3 分間または 6 分間自由に積み木を探索させた。

保持試行: 獲得試行終了後 10 秒以内に、test chamber 内に exploring chamber 内にあった積み木のうち 1 つ (B) と新奇の積み木 1 つ (F) を等間隔に設置し、仕切り版を持ち上げ、マウスを test chamber に移動させる。その後 3 分間自由に積み木を探索させた。

これらすべての試行は真上からビデオカメラで撮影し、その画像をもとに、各積み木での滞在時間をストップウォッチにより測定した。保持試行での各積み木での滞在時間を以下の式に当てはめ、認識率 (recognition index) を求めた。

$$\text{Recognition index (\%)} = (\text{TF} \times 100) / (\text{TB} + \text{TF})$$

TB: exploring chamber 内にあった積み木での滞在時間 (sec)

TF: 新奇の積み木での滞在時間 (sec)

薬物の作用の検討においては、メチルフェニデートを腹腔内投与し、その 20 分後から馴化試行を開始した。

2-2-3 オープンフィールド試験 (open field test)

オープンフィールド試験には第 1 章 2-2-4 で示した試験装置を使用した。新規環境下におけるマウスの立ち上がり行動 (rearing behavior) の観察においては、マウスを試験装置に入れ、その後 5 分間の行動を観察した。5 分間におけるマウスの立ち上がり行動を計測した。

メチルフェニデートおよび MK-801 のマウス行動に及ぼす影響に関しては、試験装置内にマウスを置き、マウスの行動を観察した。30 分後、マウスに薬物または溶媒を腹腔内投与し、再び装置内にマウスを戻し、その後 90 分間マウス

の行動の観察を行った。装置内でのマウスの行動をビデオカメラにより撮影し、その後 Etho Vision XT (Noldus) により 5 分毎の総移動距離を算出した。

また、薬物投与後 5 分間の立ち上がり行動の回数、または毛づくろい (grooming behavior)、身体を舐める行動 (licking behavior)、引っ掻き行動 (scratching behavior)、床をなめる行動等のその他常同行動回数、持続時間をカウンターおよびストップウォッチを用いて計測した。

2-2-4 カタレプシー測定

マウスにハロペリドール (0.1、0.25、0.5 および 1.0 mg/kg) または溶媒である 0.3%酒石酸を腹腔内投与し、1 時間後にマウスのカタレプシー保持時間の測定を行った。カタレプシーは、3.5 cm の高さに地面と水平に設置した直径 0.3 cm の円柱の棒にマウスの前肢をおき、前肢が棒から離れるまでの時間をストップウォッチを用いて計測した。カタレプシー保持時間の最大は 2 分間とした。この試行を 3 回繰り返し、その平均値をカタレプシー保持時間とした。

2-2-5 マウス線条体における組織モノアミン含量測定

2-2-5-1 脳摘出

マウスを断頭し、脳を摘出した。摘出した脳は、氷冷したガラスシャーレの上に置き、線条体を切り分けた。組織は、マイクロチューブの中に入れ、重量を測定後、液体窒素を用いて急速冷凍した。サンプルは試料調製まで -80°C に保存した。

2-2-5-2 サンプル前処理

脳サンプルに EDTA 2Na および 1 µg/mL dl-イソプレテノール [内部標準:

Internal standard (IS)] を含む 0.2 N 過塩素酸溶液を加え、ホモジナイズし、氷中で 60 分間冷却した。その後遠心分離 (約 4°C、12,000 rpm、5 分間) し、上清を 0.45 µm 孔フィルター (Millex-LH, Millipore, Tokyo, Japan) によりろ過し、測定試料とした。

2-2-5-3 HPLC-ECD 機器

HPLC-ECD 装置として、HTEC-500 (Eicom, Kyoto, Japan) および分離カラム (Eicompak SC-5ODS 2.1×150 mm, Eicom) を用い、移動相には以下の組成を用いた。

17% メタノールを含む 0.1 M 酢酸-クエン酸緩衝液 (pH 3.5)、5 mg/L EDTA 2Na および 190 mg/L 硫酸オクチルナトリウム グラッシーカーボン電極の設定加電圧は Ag/AgCl 参照電極に対して +0.70 V とし、流量は 0.23 ml/min とした。プレカラムおよびカラムの温度は 25°C に維持した。

2-2-5-4 測定方法

HPLC-ECD システム (Eicom) は、移動相をデカッサーに通し、ポンプシステムに通液した。標準液または測定試料は、その 20 µL を冷却器およびシリンジポンプ付きオートサンプラーを用いて自動注入した。

モノアミンおよびその代謝物の分離カラムは、プレカラムおよび分離カラムからなり、HPLC-ECD システムから出力したデータを生データとした。測定には、DA、DOPAC、5-HT および 5-HIAA のそれぞれの検量線を用い、それらをもとに算出した。

2-2-6 組織免疫染色

2-2-6-1 組織切片作製

マウスはペントバルビタール麻酔下で開胸し、ペリスタポンプ (Atto, Tokyo, Japan) を用いて生理食塩水を左心室内に注入して灌流し、ついで 4% PFA 含有 0.1 M phosphate buffer (PB: pH 7.4) を 10 分間注入し固定した。その後、脳を取り出し、同固定液中に一晩放置した。固定した脳は 25% スクロース含有 0.1 M PB (pH 7.4) 液に 24 時間浸した後、液体窒素を用いて O.C.T. compound 中に凍結包埋し、クライオスタット (Leica, Tokyo, Japan) を用いて、-20°C で厚さ 14 μ m の切片を作製し、MAS コーティングされたスライドガラス (S-9441, Matsunami, Osaka, Japan) に貼付して、-80°C で保存した。

2-2-6-2 免疫染色

切片は、染色時に-80°Cより取り出し-20°Cで1時間放置した後、室温で10分間乾燥させ、0.01 Mリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffer saline: PBS: 0.137 M NaCl、2.7 mM KCl、10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、1.8 mM KH_2PO_3) に浸してO.C.T. compoundを洗浄した。その後、Super PAP pen (Daido sangyo, Tokyo, Japan) にて反応液の流出を防ぐために切片の周囲を囲んだ。0.3% H_2O_2 含有メタノールで30分間反応させた後、1% bovine serum albumin および 1.5% normal goat serum含有PBSで2時間ブロッキングした。ブロッキング後、一次抗体を用いて4°Cで一晩反応させた。その後、二次抗体にて1時間反応させ、Vectastain Elite ABC Reagentで30分間反応させた後、DAB peroxidase substrate kitを用いて染色した。染色後、蒸留水で2分間2回洗浄し、70%、95%、99%、無水エタノールの順に3分間ずつ浸し脱水した。キシレンに5分間2回浸し透徹した後、EUKITT試薬を用いてカバーガラスで封入した。

一次抗体には、抗 tyrosin hydroxylase (TH) 抗体 (1:200 dilution: Millipore) を用いた。二次抗体には、biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:1,000 dilution: Vector, Burlingame, CA, USA) を用いた。

2-2-7 ウェスタンブロット解析

2-2-7-1 試料採取

マウスを断頭し、脳を摘出した。摘出した脳は、氷冷したガラスシャーレの上に置き、線条体、前頭前皮質および海馬に切り分けた。組織は、マイクロチューブの中に入れ、重量を測定後、液体窒素を用いて急速冷凍した。サンプルはタンパク質抽出時まで -80 °C に保存した。タンパク質抽出液には、RIPA buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、1% Igepal CA-630] 1 mL に対し、protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail II および III それぞれ 10 μ L ずつ混合して用いた。組織重量の 10 倍量のタンパク質抽出液を入れ、ホモジナイザー (Physoctron, Microtec Co., Chiba, Japan) を用いて 30 秒間ホモジナイズした。その後、20 分間氷中に静置させ、10,000 \times g、4°C、20 分間遠心分離した。遠心分離した上清を回収し、タンパク質抽出液とした。

2-2-7-2 タンパク質定量

タンパク質定量は BCA protein assay kit を用いて行った。標準曲線の作製のためのサンプルとして、0、25、125、250、500、750、1,000、1,500 および 2,000 μ g/mL の濃度に調製した bovine serum albumin を用いた。それぞれのタンパク質抽出液は、RIPA buffer で 10 倍希釈して用いた。Working reagent を添加後、サンプルを 37°C のインキュベーター中で 30 分間反応させ、その後 532 nm の吸光度を

Varioskan Flash (Thermo Scientific) を用いて測定した。タンパク質濃度をもとに、Sample Buffer Solution および RIPA buffer を用いてサンプルを調整し、-80°C に保存した。

2-2-7-3 電気泳動および転写

タンパク質濃度を調整したサンプルを-80°C から取り出し、氷上で融解させた後 100°C で 5 分間煮沸処理し、室温にて軽くスピンドウンした。1 well 当たりの添加量は、分子量マーカーを 5 μ L、各サンプルを 5 μ g とした。サンプルを添加後、ゲル 1 枚当たり 20 mA で 90 分間泳動した。泳動後、ゲルを cathode buffer (25 mM tris、40 mM 6-amino hexanoic acid) に 15 分間浸した。転写膜はメタノールに 30 秒間浸し、超純水に 15 分間浸した。その後、anode buffer 2 (25 mM tris) に 15 分間浸した。陽極側から、anode buffer 1 (0.3 M tris) に浸したろ紙、anode buffer 2 に浸したろ紙、転写膜、ゲル、2 枚の cathode buffer に浸したろ紙の順に重ね、膜 1 枚当たり 100 mA で 45 分間転写した。

2-2-7-4 ウェスタンブロッティング

転写後、0.05% Tween 20 含有 50 mM TBS (T-TBS: 10 mM tris、40 mM tris hydrochloride、150 mM NaCl) で洗浄し、Block One-PまたはT-TBSで 10 倍希釈したブロックエースに浸して、それぞれ室温で 30 分間または 1 時間ブロッキングした。その後再びT-TBSで洗浄し、Can get signal solution 1 またはT-TBSで 10 倍希釈したブロックエースで希釈した一次抗体に浸し、4°Cで一晩反応させた。その後、転写膜はT-TBSで洗浄し、Can get signal solution 2 またはT-TBSで 10 倍希釈したブロックエースで希釈した二次抗体に浸し、室温で 1 時間静置させた。T-TBSで洗浄した後、イムノスター[®]LDに 5 分間浸した。その後、Luminescent

image analyzer LAS-4000 UV mini (Fujifilm, Tokyo, Japan) および Multi Gauge Ver. 3.0 (Fujifilm) を用いて検出した。

一次抗体には、Monoclonal Anti-D1 Dopamine Receptor antibody (1:500 dilution; Sigma Aldrich)、Anti-Dopamine D2 Receptor (1:1,000 dilution; Millipore)、Anti-phospho-GluR1 (Ser 845) clone EPR 2184, Rabbit Monoclonal (1:2,000 dilution; Millipore)、Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (197G2) Rabbit mAb (1:1,000 dilution; Cell signaling, Danvers, MA, USA)、p44/42 MAPK (Erk1/2) Rabbit pAb、anti-GAPDH Rabbit mAb (1:1,000 dilution; Cell signaling) および monoclonal anti- β -actin (1:5,000 dilution; Sigma Aldrich) を用いた。二次抗体には、HRP (horseradish peroxidase)-conjugated goat anti-mouse IgG および HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:2,000 dilution; Thermo Scientific) を用いた。

2-2-8 統計学的解析

実験成績は平均値 \pm 標準誤差 (SEM) で示した。統計学的な解析は JSTAT (Vector) または Statistical Package for the Social Science 15.0J for Windows software (SPSS Japan Inc., Tokyo, Japan) を用いて行った。2 要因の分散分析を行った後に Bonferroni 多重検定を、1 要因の分散分析を行った後に Student's t 検定、Tukey's 検定または Dunnett's 検定により統計解析を行った。危険率が 5%未満を有意差ありとした。

第3節 実験成績

3-1 DGK β 欠損マウスの注意欠損様行動

DGK β 欠損マウスの注意欠損行動を検討するために、既報 (Alkam et al., 2011) に従い object-based attention test を行った。この試験においては、3 分間または 6 分間の獲得試行の後に保持試行を行った (Fig. 16A, D)。これまでの報告において、3 分間の獲得試行の後の保持試行における成績は注意力に依存するもの、6

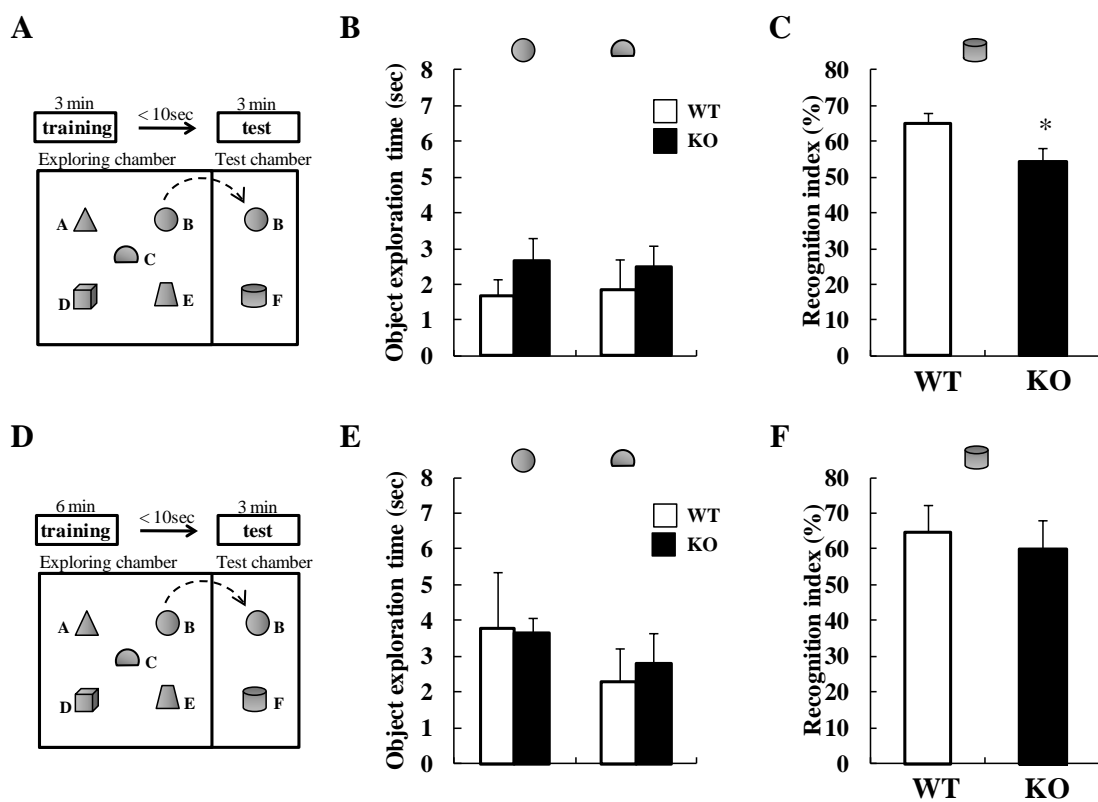


Fig. 16 DGK β KO mice showed an attention-deficit behavior in object based attention test.

(A) Mice were exposed to five object for 3 min (training session), then, after an interval of 10 sec, they were exposed to two objects that include a familiar and a novel objects for 3 min (retention session). (B) Object exploration time during the 3- min training session. (C) The novel-object discriminating abilities of mice were expressed as a recognition index. Values are expressed as the mean \pm SEM. (KO: n = 8, WT: n = 9) * p < 0.05 vs. WT mice (t -test). (D) Mice were exposed to five objects for 6 min (training session), then, after an interval of 10 sec, they were exposed to two objects that include a familiar and a novel objects for 3 min (retention session). (E) Object exploration time during the 6-min training session. (F) The novel object discriminating abilities of mice were expressed as a recognition index. Values are expressed as the mean \pm SEM. (KO: n = 6, WT: n = 7).

分間の獲得試行の後の保持試行における成績は海馬依存性の学習に依存するものであることが知られている (Alkam et al., 2011)。3 分間および 6 分間いずれの獲得試行においても、二種類の積み木に対するマウスの探索時間は、野生型マウスおよび DGK β 欠損マウスの両方において明らかな変化は認められなかった (Fig. 16B, E)。このことから、新奇の積み木に対する嗜好性には DGK β の遺伝子差がないことが確認された。つぎに、3 分間獲得試行の後の保持試行においては、DGK β 欠損マウスにおいては、新奇の積み木に対する探索の割合は野生型マウスのものに比べ有意に減少していた (Fig. 16C)。この結果より、DGK β 欠損マウスにおいては、野生型マウスに比べ、注意力の低下が示唆された。一方、6 分間の獲得試行を行った後の保持試行における野生型マウスおよび DGK β 欠損マウスの新奇の積み木に対する認識率においては、有意な変化は認められなかった (Fig. 16F)。このことから、物体の認識における海馬依存学習能力においては、野生型マウスおよび DGK β 欠損マウス間に差がないことが示唆された。

3-2 DGK β 欠損マウスの注意欠損様行動に対するメチルフェニデートの作用

注意力の欠損は ADHD の症状のひとつであり、一般的に治療薬のメチルフェニデートによって改善されることが知られている。そこで、つぎに DGK β 欠損マウスにおいて認められた注意欠損の表現型がメチルフェニデートの投与によって改善されるかを検討した。試験全体を通して、メチルフェニデートの投与はマウスの積み木への探索時間を減少させた (Fig. 17)。野生型マウスにおいては、保持試行においてメチルフェニデート処置により新奇の積み木の認識率の有意な低下が認められ (Fig. 18)、このことから注意力の低下が惹起されたことが明らかとなった。

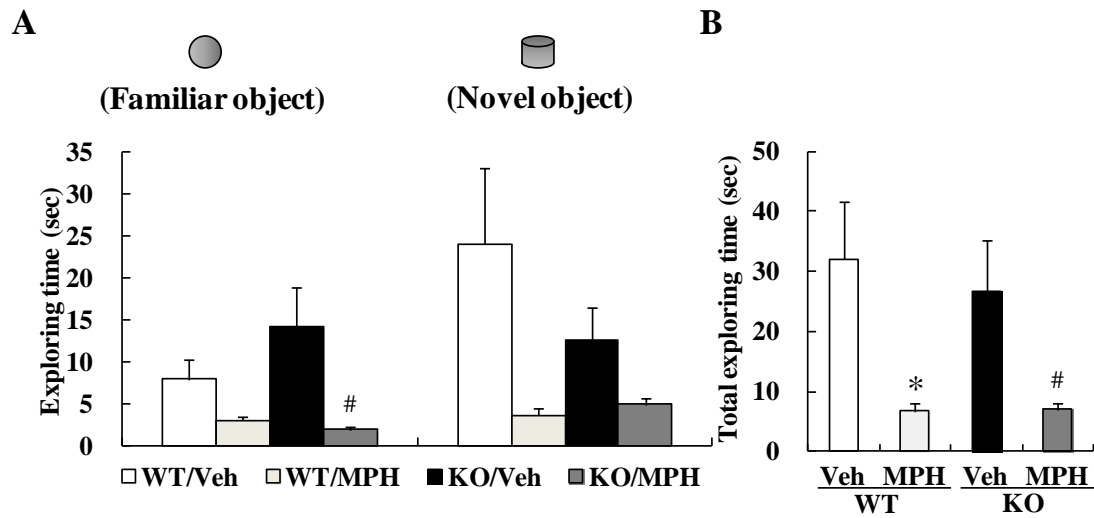


Fig. 17 The time spent exploring each objects in the retention test of object-based attention test. (A) Object exploration time of vehicle or methylphenidate (MPH) treated mice during the retention test after 3-min training session. (B) Total exploration time of vehicle or MPH treated mice during the retention test after 3-min training session. Values are expressed as the mean \pm SEM. (n = 6 or 7) * p < 0.05 vs. vehicle-treated WT mice, # p < 0.05 vs. vehicle-treated KO mice.

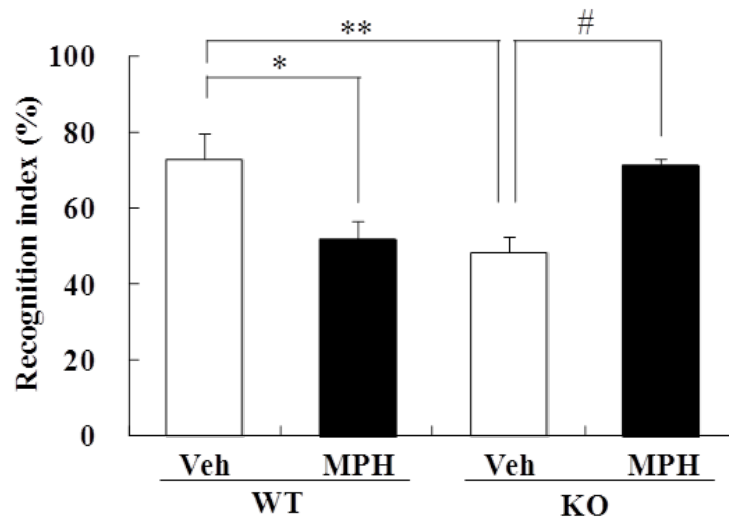


Fig. 18 The effect of methylphenidate (MPH) on the attention-deficit behavior of DGK β KO mice in the object-based attention test.

The effect of MPH on the recognition index in retention phase after 3-min training phase. Values are expressed as the mean \pm SEM. (n = 6 or 7) * p < 0.05, ** p < 0.01 vs. vehicle-treated WT mice, # p < 0.05 vs. vehicle-treated KO mice (Tukey's test).

一方、DGK β 欠損マウスにおいては、メチルフェニデートの投与によって新奇の積み木の認識率の有意な増加が認められた (Fig. 18)。この結果より、DGK β 欠損マウスにおいて認められた注意欠損の表現型はメチルフェニデートの投与により改善することが明らかとなった。

3-3 DGK β 欠損マウスの新奇環境下での立ち上がり行動

新奇環境下におけるマウスの立ち上がり行動を評価するため、マウスをオープンフィールド試験装置に放ち、その直後から 10 分間の立ち上がり行動回数の計測を行った。試験開始から 5 分間において、DGK β 欠損マウスの立ち上がり回数は有意に増加した [WT (n = 5): 10.2 \pm 3.7 回 (0~5 分間), 25.6 \pm 3.7 回 (5~10 分間), KO (n = 7): 24.4 \pm 4.5 回 (0~5 分間), 39 \pm 5.0 回 (5~10 分間)] (Fig. 19A)。また、10 分間での立ち上がり総回数も野生型マウスに比べ、DGK β 欠損マウスにおいては、有意に増加した (Fig. 19B)。

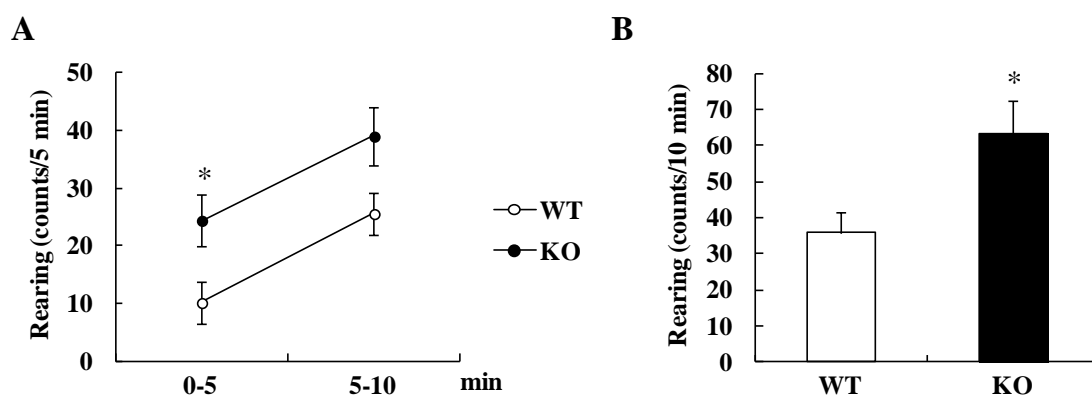


Fig. 19 Rearing behavior of DGK β KO mice in the novel environment.

(A) In the open field test, rearing behavior was counted manually every 5 min for 10 min. (B) The total number of rearing behavior. Values are expressed as the mean \pm SEM. (WT: n = 5, KO: n = 7) * $p < 0.05$ vs. WT mice (t -test).

3-4 メチルフェニデート投与後の野生型マウスおよび DGK β 欠損マウスの行動変化

3-4-1 自発活動量に関する検討

メチルフェニデートは先に述べたように ADHD の治療薬として使用されているが、一般的に野生型マウスにおいては細胞外のドパミン量を増加させ、結果的に自発活動量を増加させる (Carlsson and Carlsson, 1989)。まず初めに、種々濃度のメチルフェニデートを野生型マウスおよび DGK β 欠損マウスに投与し、その自発活動量の変化を 90 分間観察した。これまでの検討と同様、溶媒投与を行った DGK β 欠損マウスの自発活動量は、野生型マウスに比べ有意に増加した (Fig. 20A)。野生型マウスにおいて、メチルフェニデート投与を行うと自発活動量は増加し、3、30 mg/kg メチルフェニデート投与群において有意な自発活動量の増加が認められた (i. p., MPH 0.3 mg/kg; $p = 0.318$, MPH 3 mg/kg; $p = 0.005$, and MPH 30 mg/kg; $p = 0.003$ vs. vehicle-treated WT mice) (Fig. 20A)。しかしながら、DGK β 欠損マウスにおいてメチルフェニデート投与による自発活動量の変化は認められなかった (MPH 0.3 mg/kg; $p = 1.000$, MPH 3 mg/kg; $p = 0.958$, and MPH 30 mg/kg; $p = 1.000$ vs. vehicle-treated KO mice) (Fig. 20A)。また、メチルフェニデート 30 mg/kg 投与後の自発活動量の経時的な変化を検討した。野生型マウスにおいて、メチルフェニデート投与後に急激な自発活動量の増加が認められ、その後低下した後、再度溶媒投与群に比べ有意な増加が継続的に認められた (Fig. 20B)。野生型マウスに比べ、DGK β 欠損マウスにおいては、メチルフェニデートはわずかに自発活動量を増加させた。30~35 分の時点における自発活動量の変化においては、有意な遺伝的要因 [$F(1, 24) = 9.01, p < 0.01$]、薬物要因 [$F(1, 24) = 31.69, p < 0.001$]が認められ、また遺伝子・薬物の作用において交互作用が認められた [$F(1, 24) = 14.32, p < 0.001$]。

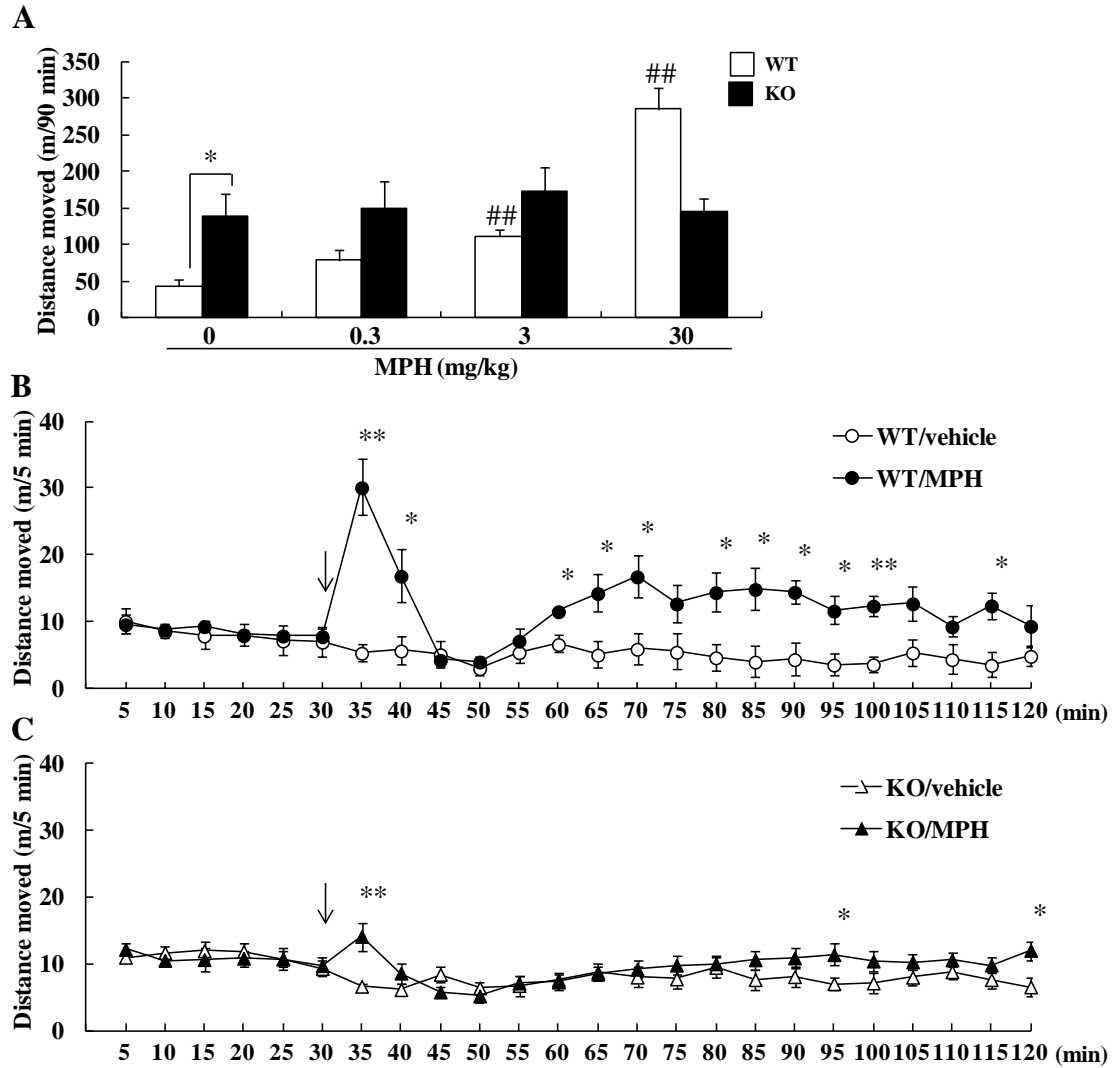


Fig. 20 DGK β KO mice showed an abnormal response to methylphenidate (MPH).

(A) The locomotor activity after various doses of MPH. Each mouse was placed in a locomotor activity monitor for an initial period of 30 min and then injected with vehicle or MPH (0.3, 3, 30 mg/kg, i.p.). Horizontal activities of 90 min after drug treatment were recorded. Values are expressed as the mean \pm SEM. (n = 5) * p < 0.05 vs. vehicle-treated WT mice (t-test), # p < 0.05, ## p < 0.01 vs. vehicle-treated WT mice (Dunnett's test). Each mouse was placed in a locomotor activity monitor for an initial period of 30 min (shown as arrow) and then injected with vehicle or MPH (30 mg/kg). Horizontal activity was recorded every 5 min for a 2-h period. Locomotor activity throughout the 2-h period of WT (B) and DGK β KO (C) mice. Values are expressed as the mean \pm SEM. (n = 4 to 10) * p < 0.05, ** p < 0.01 vs. vehicle-treated group (t-test).

3-4-2 常同行動に関する検討

メチルフェニデート投与後の常同行動を 5 分間計測した。立ち上がり行動の回数は、溶媒投与を行った DGK β 欠損マウスでは野生型マウスに比べこの時点においても有意に増加した。メチルフェニデート投与後においては、DGK β 欠損マウスにおいて認められる立ち上がり行動の増加は野生型マウスのレベルまで有意に減少した (Fig. 21A)。また、立ち上がり行動以外の常同行動を行っていた時間に関しては、溶媒投与群において野生型マウスに比べ DGK β 欠損マウスでは減少傾向が認められたが、その差は有意ではなかった ($p = 0.056$)。メチルフェニデート投与後において、野生型マウスでは常同行動を行っていた時間は有意に低下したが、DGK β 欠損マウスでは変化は認められなかった (Fig. 21B)。これらの結果から、DGK β 欠損マウスにおいてはメチルフェニデートによる自発活動量の改善は認められないものの、野生型マウスに比べて異なる反応性を示すことが明らかとなった。

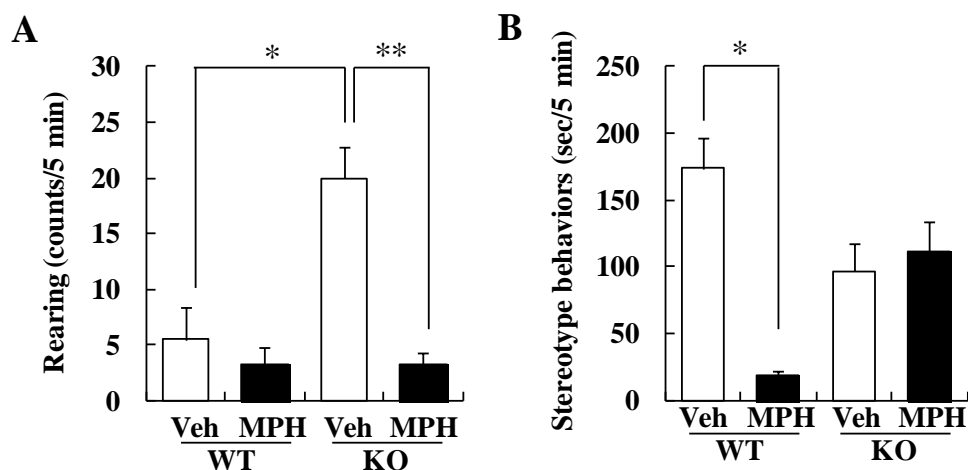


Fig. 21 Change of stereotype behavior DGK β KO mice and WT mice after methylphenidate (MPH) treatment.

(A) Rearing behavior of MPH/vehicle treated WT and KO mice for 5 min after drug treatment. Values are expressed as the mean \pm SEM. (n = 4 to 10) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. vehicle-treated KO mice group (t -test). (B) The duration of the stereotyped behaviors for 5 min after drug treatment. Values are expressed as the mean \pm SEM. (n = 4 to 10) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. vehicle-treated WT mice group (t -test).

3-5 MK-801 投与後の野生型マウスおよび DGK β 欠損マウスの行動変化

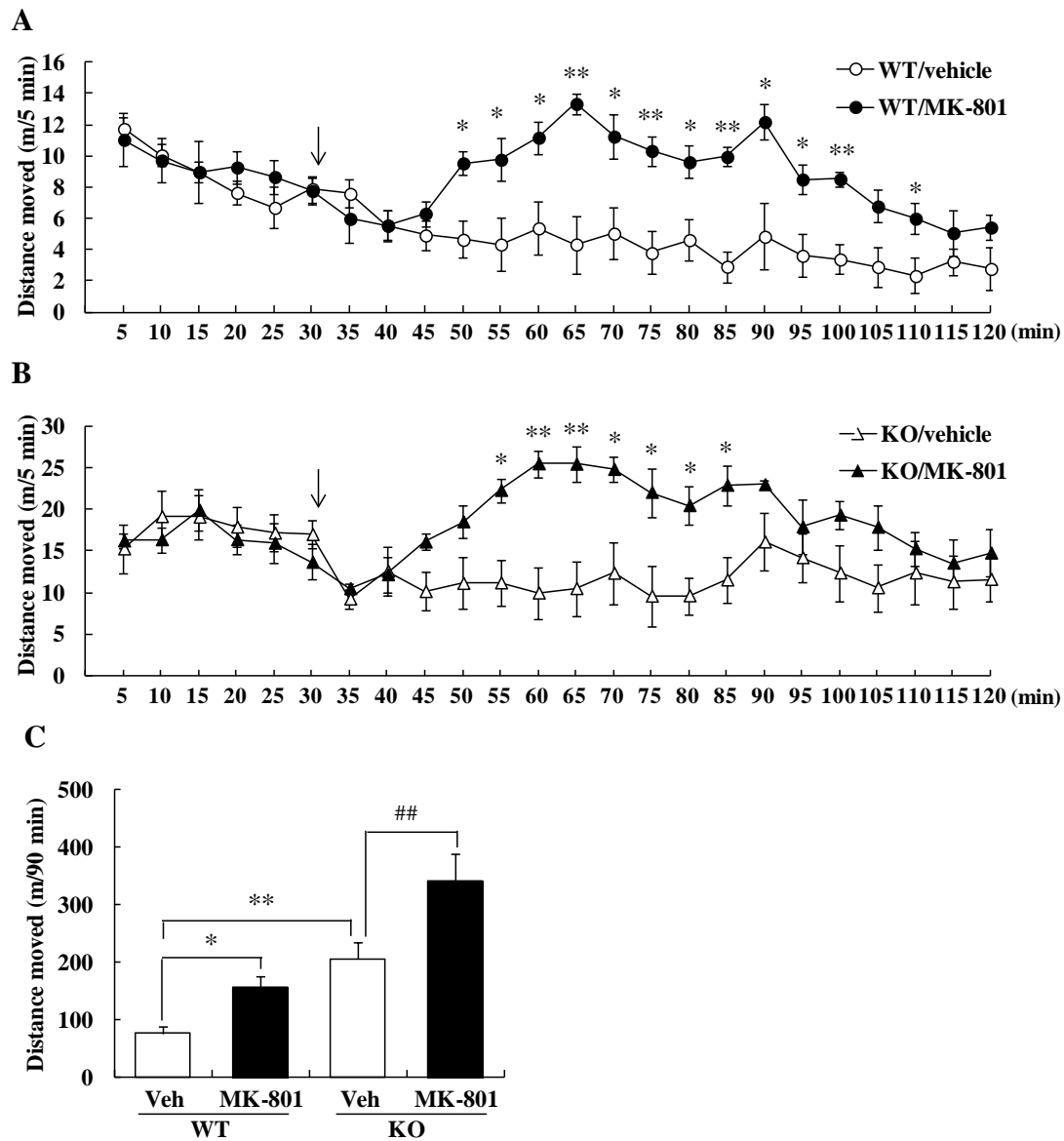


Fig. 22 DGK β KO mice showed normal responses to MK-801-induced hyperactivity.

Each mouse was placed in a locomotor activity monitor for an initial period of 30 min (shown as arrow) and then injected with vehicle or MK-801 (0.3 mg/kg). Horizontal activity was recorded every 5 min for a 2-h period. Locomotor activity throughout the 2-h period of WT (A) and DGK β KO (B) mice. Values are expressed as the mean \pm SEM. (n = 4 or 5) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (C) Total horizontal activities of 90 min after drug treatment were recorded. Values are expressed as the mean \pm SEM. (n = 4 or 5) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. vehicle-treated WT mice (t -test), ## $p < 0.01$ vs. vehicle-treated KO mice (t -test).

マウスにおいては、ドパミンの神経伝達のみではなく、グルタミン酸の神経伝達もまた自発活動量に変化を及ぼすことが知られている (Carlsson and Carlsson, 1989; Gainetdinov et al., 2001)。本検討では、*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体のアンタゴニストである MK-801 (dizocilpine) を用いて、自発活動量に対する作用を検討した。前述したメチルフェニデートの作用とは異なり、MK-801 は野生型マウスおよび DGK β 欠損マウスの両方において、有意な自発活動量の亢進作用を示した。MK-801 または生理食塩水投与後 90 分間の活動量において、二元配置の分散分析の結果、MK-801 処置の効果 [$F(1, 14) = 11.33, p < 0.001$] および遺伝子の効果 [$F(1, 14) = 24.65, p < 0.001$] において有意であったが、MK-801 処置と遺伝子の交互作用は認められなかった [$F(1, 14) = 0.79$] (Fig. 22)。

3-6 DGK β 欠損マウスの線条体におけるドパミンシステム

3-6-1 線条体におけるモノアミンおよびその代謝物の組織含量

これまでの結果より、DGK β 欠損マウスはメチルフェニデートに対して低反応

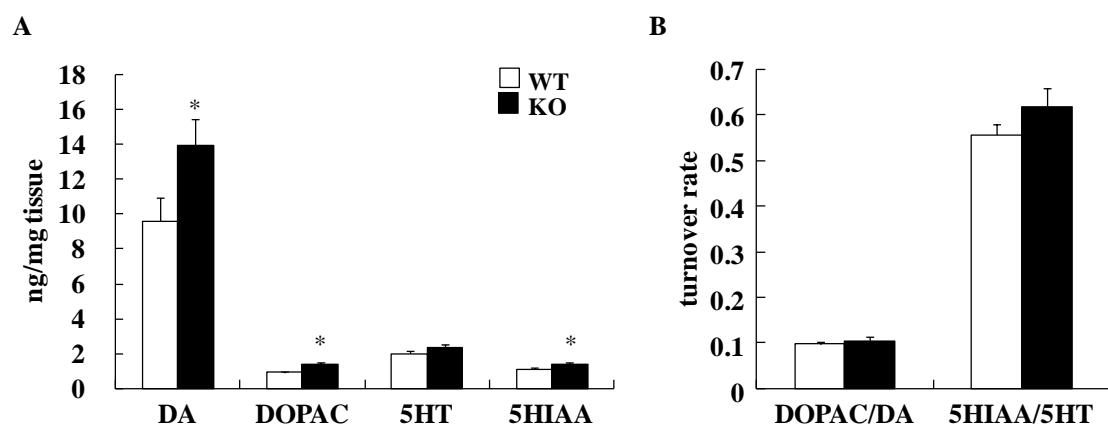


Fig. 23 Monoamine and its metabolite in the striatum of the DGK β KO mice.

(A) Levels of monoamine neurotransmitters and their major metabolites were assayed in striatum of controls ($n = 8$) and DGK β KO ($n = 10$) mice. Values are expressed as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. WT mice (t-test). (B) The metabolic turnover of monoamine in the striatum of WT and DGK β KO mice. Values are expressed as the mean \pm SEM. ($n = 8$ or 10). DA: Dopamine, DOPAC: 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, 5-HT: Serotonin, 5-HIAA: 5-hydroxyindol acetic acid

性を示すが、NMDA 受容体アンタゴニストに対しては通常の反応性を示すことが明らかにした。前述したように、メチルフェニデートはドパミントランスポーター (DAT) 阻害によりシナプス間隙におけるドパミン量を増加させることでその中枢神経刺激作用を発揮する。活動量の増加には、線条体におけるドパミン量の変化が密接に関与していることから (Beaulieu et al., 2006)、線条体のドパミンの含量について検討した。線条体において、DGK β 欠損マウスはドパミン、その代謝物である DOPAC およびセロトニンの代謝物である 5-HIAA の含量が増加していた (Fig. 23A)。一方、ドパミンおよびセロトニンの代謝回転率には変化がみられなかった (Fig. 23B)。

3-6-2 線条体におけるドパミン合成酵素量

DGK β 欠損マウスでは、線条体におけるドパミン含量の増加が認められたため、ドパミン合成酵素であるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) について免疫染色法を用いて検討した。TH 陽性の神経線維の染色強度においては、変化は認められなかった (Fig. 24A, B)。以上、線条体におけるドパミン作動性神経には野生型マウスおよび DGK β 欠損マウス間で差が認められなかった。

3-6-3 線条体におけるドパミン受容体の発現量

メチルフェニデートに対する反応性の違いが、線条体におけるドパミンの受容体発現レベルの変化によるものであるかを検討するため、ドパミン D1 および D2 受容体の発現量について、ウェスタンブロット法を用いて検討した。野生型マウスおよび DGK β 欠損マウス間での、線条体におけるドパミン D1 および D2 受容体の発現量に差は認められなかった (Fig. 24C, D)。

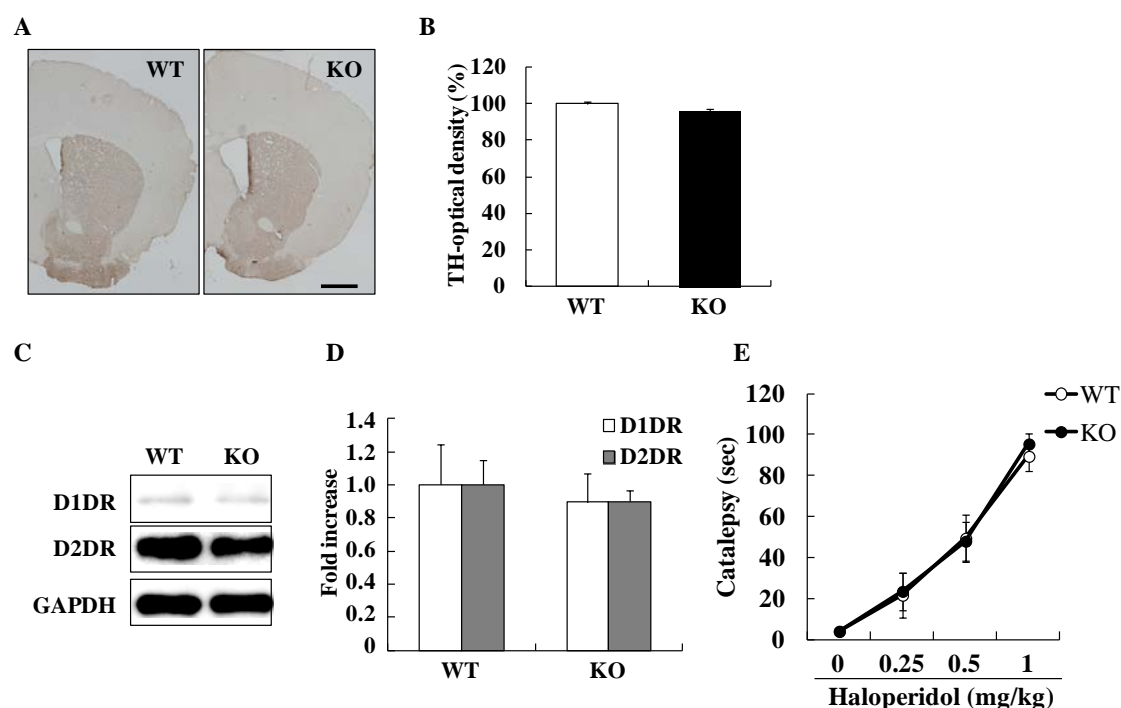


Fig. 24 Dopaminergic systems in the striatum of the DGK β KO mice.

(A) Typical photograph of the coronal sections of the striatum immunostained for tyrosine hydroxylase (TH) of WT and DGK β KO mice. Scale bar shows 300 μ m. (B) TH-positive density in the striatum of WT and DGK β KO mice. Values are expressed as the mean \pm SEM. (n = 3). (C) Representative immunoblots showing the expression levels of D1 dopamine receptor (D1DR) and D2 dopamine receptor (D2DR) in the striatum of WT and DGK β KO mice. (D) Protein levels of D1DR and D2DR are quantified relative to the GAPDH levels. Values are expressed as the mean \pm SEM. (n = 6). (E) The retention time of haloperidol-induced catalepsy of WT and DGK β KO mice. Values are expressed as the mean \pm SEM. (n = 6 to 12).

3-6-4 ハロペリドール誘発カタレプシー保持時間

過去にメチルフェニデートと同様に、シナプス終末へのドパミンの再取り込みを抑制するメタンフェタミンに対して低反応性を示す動物において、ドパミン D2 受容体の機能不全が報告されている (Shioda et al., 2009)。このことから、ドパミン D2 受容体遮断作用をもつハロペリドールを用いて、ドパミン D2 受容体機能についての検討を行った。ハロペリドールは野生型マウスにおいて用量依存的にカタレプシー保持時間を増加させた。DGK β 欠損マウスにおいても、用

量依存的にカタレプシー保持時間を増加させ、野生型マウスと同様の反応性を示した (Fig. 24E)。

以上の結果より、DGK β 欠損マウスは、線条体においてドパミン等のモノアミン含量に増加が認められたが、ドパミンの合成酵素および受容体の発現・機能は正常であることが示された。

3-7 メチルフェニデート投与後のタンパク質リン酸化レベル

3-7-1 ERK 1/2 リン酸化

精神刺激薬投与後の活動量変化においては、線条体における ERK1/2 のリン酸化

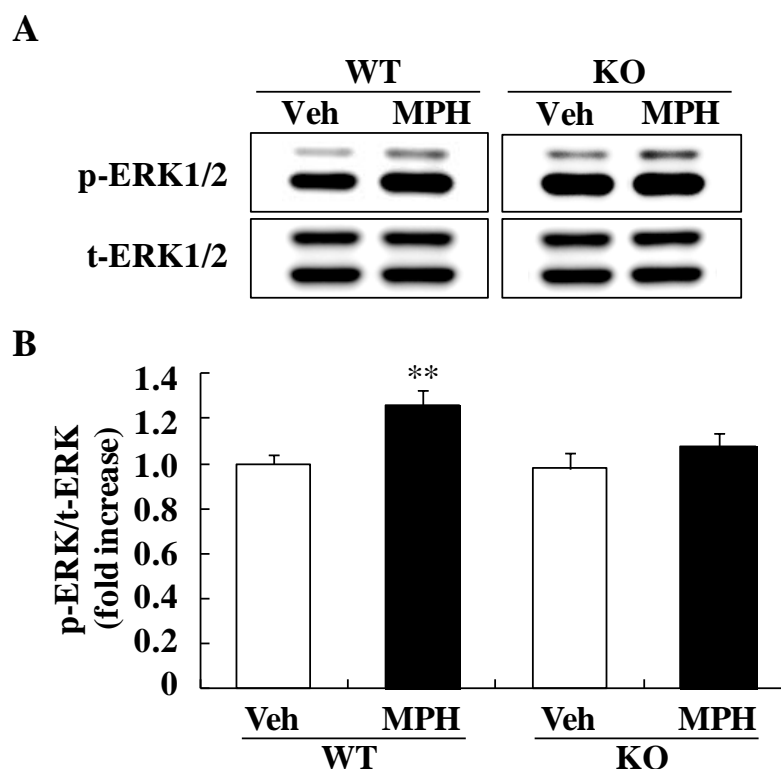


Fig. 25 Western blot analysis of the phosphorylation levels of ERK1/2 in the striatum following methylphenidate (MPH) treatment.

Phosphorylated and total ERK1/2 levels in the striatum were measured by Western blot analysis. (A) Representative immunoblots showing the expression levels of phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1/2) and total ERK (t-ERK) in the striatum of WT and DGK β KO mice 5 min after drug treatment. (B) Phosphorylation levels of ERK1/2 are quantified relative to the t-ERK1/2 levels. Values are expressed as the mean \pm SEM. (n = 5 to 8) ** p < 0.01 vs. vehicle-treated WT mice group (t -test).

化の関連が示唆されている (Beaulieu et al., 2006)。このことから、メチルフェニデート投与後の線条体におけるリン酸化 ERK1/2 の発現量についての検討を行った。通常条件下において、野生型マウスおよび DGK β 欠損マウスの線条体でのリン酸化 ERK1/2 の発現量に変化は認められなかった (Fig. 25AB)。

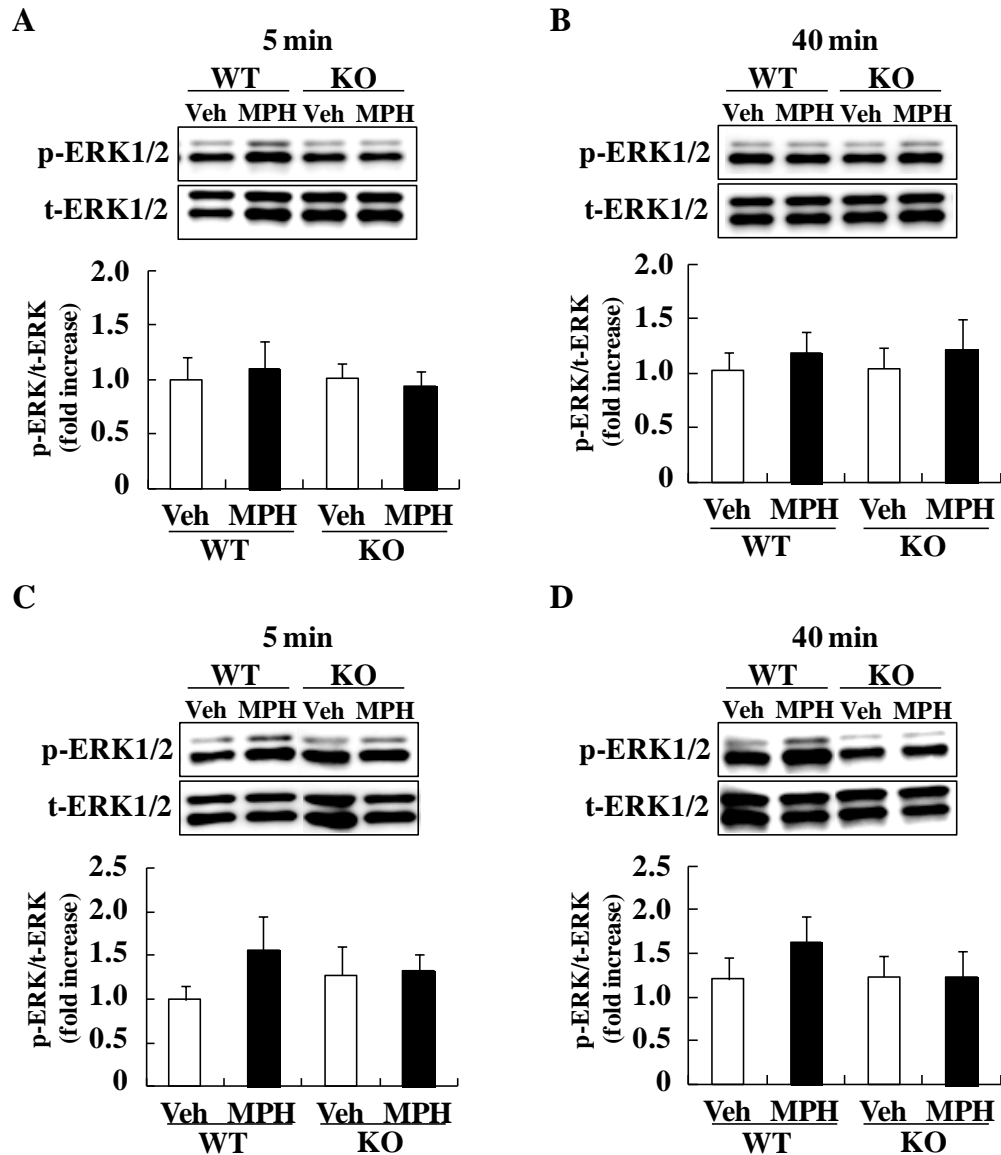


Fig. 26 Western blot analysis of the phosphorylation levels of ERK1/2 in the prefrontal cortex and hippocampus following methylphenidate (MPH) treatment.

Phosphorylated and total ERK1/2 levels in the hippocampus were measured by Western blot analysis after 5 min (A) or 40 min (B) of MPH treatment. Phosphorylated and total ERK1/2 levels in the prefrontal cortex were measured by Western blot analysis after 5 min (A) or 40 min (B) of MPH treatment. Values are expressed as the mean \pm SEM. (n = 6).

メチルフェニデート投与 5 分後において、野生型マウスではリン酸化 ERK1/2 の発現量が有意に増加した。一方、DGK β 欠損マウスではそのような変化は認められなかった (Fig. 25A, B)。また、線条体以外の部位においても、メチルフェニデートによりリン酸化 ERK1/2 の発現量に変化が生じるかを検討した。海馬および前頭前皮質において、薬物処置 5 分後および 40 分後において検討したが、いずれの部位・時間においても、リン酸化 ERK1/2 の発現量に変化は認められなかった (Fig. 26A-D)。この結果より、メチルフェニデートは線条体に特異的に作用していることが示唆された。

3-7-2 グルタミン酸受容体 1 (glutamate receptor 1:GluR1)リン酸化

メチルフェニデート投与後の ERK1/2 以外の経路について検討するため、メチルフェニデート投与後の線条体における α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソオキサゾールプロピオン酸 (AMPA) 受容体サブユニットの GluR1 の Ser845 残基におけるリン酸化について検討を行った。メチルフェニデート投与 40 分後の線条体において、野生型マウスおよび DGK β 欠損マウスともにリン酸化 GluR1 の発現量が上昇した (Fig. 27A, B)。

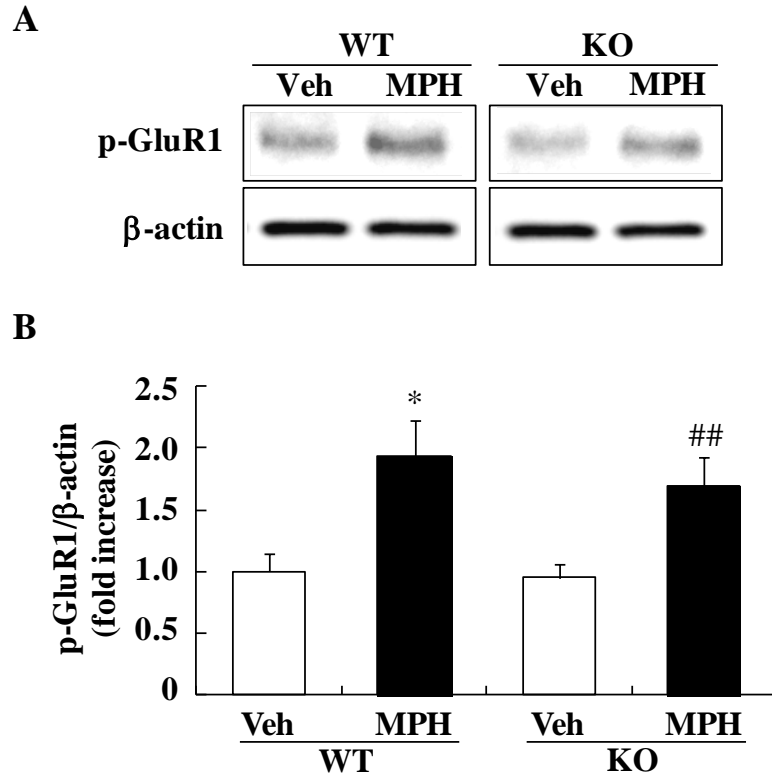


Fig. 27 Western blot analysis of the phosphorylation levels of GluR1 in the striatum following methylphenidate (MPH) treatment.

(A) Representative immunoblots showing the expression levels of phosphorylated GluR1 (p-GluR1) in the striatum of WT and DGK β KO mice 40 min after drug treatment. (B) Phosphorylation levels of GluR1 are quantified relative to the β -actin levels. Values are expressed as the mean \pm SEM. (n = 6 to 8) * p < 0.01 vs. vehicle-treated WT mice group, ## p < 0.01 vs. vehicle-treated KO mice group (t -test).

第4節 考察

本検討は、DGK β 欠損マウスが ADHD モデルとして有用であるか否かを明らかにすることを目的として行った。ADHD は注意の欠陥、衝動性、過活動に特徴付けられる疾患である。今回の検討から、DGK β 欠損マウスは、注意欠損行動と過活動が認められた。注意欠損行動に関しては、ADHD の治療薬として用いられているメチルフェニデートによって改善された。一方、メチルフェニデート投与後の自発活動量の変化に関しては、実際の ADHD 患者やモデル動物において認められる反応とは自発活動量が抑制されなかった点で同様のものではなかった。しかしながら、メチルフェニデートの慢性的な処置や、他の ADHD 治療薬の投与によって DGK β 欠損マウスの過活動が改善される可能性は十分に考えられる。現時点では、ADHD 患者における DGK β 遺伝子の異常等の報告はなされていないが、今後詳細な検討を行うことで ADHD 病態における DGK β の関与が明らかになると考えられる。

現在までに、動物の注意力の検出にはいくつかの行動試験が用いられている。例えば、5-選択反応時間課題 (5-choice serial reaction time task) は注意力を検出する試験のうちの一つであるが、動物が物体の認識を行うために長期間のトレーニング時間を要する (Bari et al., 2008)。本検討で用いた Object-based attention test は短期間で動物の注意力の検出が可能な試験であり、その有用性はパラクロロフェニルアラニン(p-chlorophenylalanine)、フェンサイクリジン (phencyclidine) 投与マウスにおいて認められている (Alkam et al., 2011)。これまでの検討から、DGK β 欠損マウスは海馬依存的な学習の障害が認められている (Shirai et al., 2010)。作業記憶と注意力は共通するものも多く、注意力は海馬の機能にも依存している (Alkam et al., 2011)。そのため、今回の結果には、海馬からの入力の影響も少なからず関与していると考えられる。

メチルフェニデートは精神刺激薬のひとつであり、DAT を阻害し、脳の様々な部位において細胞外のドパミン量を増加させることにより作用を発揮する (Volkow et al., 1998)。DAT 欠損マウス、カゼインキナーゼ I δ 過剰発現マウスおよび p35 欠損マウスは、メチルフェニデートの処置によりマウスの活動量亢進は改善される (Beaulieu et al., 2006; Krapacher et al., 2010; Zhou et al., 2010)。本検討においては、30 mg/kg という比較的高濃度のメチルフェニデートを野生型マウスに投与して検討した。自発活動量の顕著な増大が認められる一方で、一時的な活動量の減少も認められ、この経時的な変化は過去の報告と一致した (Beaulieu et al., 2006)。メチルフェニデートの DGK β 欠損マウスへの投与は、自発活動量の減少をもたらさなかったが、野生型マウスにおいて一般的に認められるような自発活動量の亢進も顕著には引き起こさなかった。しかしながら、DGK β 欠損マウスは NMDA 受容体阻害剤である MK-801 の投与によって自発活動量の増大が認められたことから、これは精神刺激薬の作用点の違いによるものであると考えられる。

また、今回は立ち上がり行動やその他の常同行動に関しても検討した。立ち上がり行動を始めとする常同行動は、精神疾患モデル動物において顕著に認められる (Verebey et al., 1981)。今回、DGK β 欠損マウスは、この立ち上がり行動の増大が認められた。ADHD モデルマウスは、垂直方向の活動量の増加が報告されており (Zhou et al., 2010)、この知見とも一致して、マウスの自発活動量の亢進に伴い生じた現象であると考えられる。これまでに、マウスの常同行動に対する精神刺激薬の作用が報告されている (Kiguchi et al., 2008; Park et al., 2011)。本検討においては、メチルフェニデート投与後 5 分間の常同行動を解析し、野生型マウスは常同行動の変化が起こるのに対し、DGK β 欠損マウスでは変化は認められなかった。この変化は、このタイムポイントにおいて、野生型マウスは

メチルフェニデート投与による急激な自発活動量の増加が認められたためであると考えられる。

これまでに、線条体における主な 3 つのシグナル経路 [1) protein kinase A/DARPP-32 (Fienberg et al., 1998; Greengard et al., 1999)、2) Akt/GSK-3 (Beaulieu et al., 2005)、3) ERK (Valjent et al., 2000; Zhang et al., 2004)] がドパミンによる自発活動量の制御に関与していると報告されている。これらの中で、特に ERK シグナリングが重要な役割を果たしていると考えられるが (Beaulieu et al., 2006)、精神刺激薬投与後の反応においての役割に関しては不明な点も多い。薬物を処置していない状態においては、野生型マウスおよび DGK β 欠損マウスの線条体においてドパミン受容体の発現量や機能に大きな変化は認められなかった。加えて、線条体におけるリン酸化 ERK1/2 の発現量の変化も認められなかった。DGK β 欠損マウスの線条体においては、有意なドパミン含量の増加が認められたものの、DGK β 欠損マウスの通常状態における自発活動量の亢進には線条体におけるドパミンシグナルの変化には影響を及ぼしていないと考えられる。

本研究において、メチルフェニデート投与後の線条体において、野生型マウスで認められたリン酸化 ERK1/2 の発現量の変化が生じなかった。過去の報告より、ドパミン D1 受容体欠損マウスや Thr-34 \rightarrow Ala DARPP-32 (T34A) 変異マウスにおいて、d-アンフェタミン投与後の線条体において、リン酸化 ERK1/2 の発現量の変化が生じないことが明らかになっている (Valjent et al., 2005)。これらの報告は本研究と同様に、精神刺激薬による D1/DARPP-32 シグナルカスケードを介した ERK1/2 のリン酸化の機序への関与を示唆している。

DGK は DG を PA に変換する酵素であり、Gq タンパク共役型受容体の下流に存在する (Kano et al., 1990)。ドパミン D2 受容体作動薬は線条体切片において、Gq タンパク質と PLC β の結合および細胞内カルシウムストアからのカルシウム

の動員を介して ERK1/2 のリン酸化を生じる (Yan et al., 1999)。ドパミン D1 受容体と D2 受容体は異なる細胞に発現していると考えられていたが、近年の研究から、ともに同じ細胞において発現していることが示唆されている (Valjent et al., 2000)。このことは、ドパミン D1 および D2 受容体の両方が ERK1/2 のリン酸化を制御し、この ERK1/2 リン酸化制御においても DGK β が関与していることを示唆している。

以前の研究において、B-Raf/C-Raf/mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK)/ERK 経路の上流に位置する Ras シグナリングに DGK アイソフォーム (α , ζ , ι) は、Ras guanyl nucleotide-releasing protein (RasGRPs) の活性を修飾することで影響を及ぼしている (Sanjuan et al., 2003) (Regier et al., 2005; Topham and Prescott, 2001)。興味深いことに、DGK η は scaffold/adaptor タンパク質として働くことで、B-Raf/C-Raf/MEK/ERK シグナルを調節する (Yasuda et al., 2009)。DGK はその構造、組織発現パターンおよび機能が様々であり、アイソフォーム毎で異なるが、DGK β もこれら B-Raf/C-Raf/MEK/ERK1/2 シグナル制御に関与している可能性も考えられる。しかしながら、ERK1/2 リン酸化における DGK β の役割の解明には、さらなる研究が必要である。

以上、DGK β 欠損マウスは注意欠損様の行動を示し、メチルフェニデートに対して、野生型マウスとは異なる反応性を示した。これらの結果は、ADHD の病態に DGK β が関与する可能性を示唆するものである。DGK β は様々な受容体シグナルの下流に存在するため、DGK β が同時に各種シグナルに関与する可能性が考えられる。DGK β の機能に関する更なる研究により、ADHD をはじめとする各種精神疾患の病態の機序が解明されるかもしれない。

第3章 DGK β 欠損マウスの痙攣感受性に関する検討

第1節 緒言

“てんかん (癲癇)”とは、脳内の細胞のネットワークに起きる異常な神経活動のためにてんかん発作を来す疾患であり、一般的には痙攣発作に特徴づけられる。日本神経学会のてんかん治療ガイドライン 2010 においては「てんかんとは慢性の脳の病気で、大脳の神経細胞が過剰に興奮するために、脳の症状（発作）が反復性（2 回以上）に起こるものである。発作は突然起こり、普通とは異なる身体症状や意識、運動および感覚の変化が生じる。明らかな痙攣があればてんかんの可能性は高い」と記載されている。その患者は 100 人に 1 人とも言われており、決して珍しい疾患ではない。現在では薬物による治療が主流となっており、バルプロ酸、ジアゼパム、カルバマゼピン等の薬物が発作の種類によって使い分けられている。現在様々な新規抗てんかん薬が開発されているにもかかわらず、全体の 3 分の 1 の患者においては薬物治療に抵抗性を示すことが報告されている (Siegel, 2004)。この薬物抵抗性の原因としてはてんかんが多因子性の疾患であり、患者それぞれによって病態が異なることが考えられ、病態の明確な原因を特定することが重要である。

てんかん発作は様々な原因により生じ、脳腫瘍や頭部外傷等の脳組織の異常によって生じるものや、何らかの原因により脳内の抑制性・興奮性のバランスが崩れることにより生じるもの等が知られている。また、海馬の主要な興奮性ニューロンが加齢に伴い増加すること、てんかん発作を起こす患者の 3 分の 1 以上が 65 歳以上であること (Wallace et al., 1998) から、加齢もてんかん発作の発症には深く関与している。一方、遺伝的な要因も数多く報告されており、イオンチャネルを始めとする遺伝子の変異がてんかん患者において報告されている (Reid et al., 2009)。

本章では、ペンチレンテトラゾールやカイニン酸等の痙攣誘発剤を DGK β 欠損マウスに投与し、痙攣感受性の検討を行った。さらに、痙攣発生時の DGK β の発現の変化の有無の検討や DGK β 欠損マウス脳内における抑制性ニューロン変化について研究を行った。

第2節 実験材料および方法

2-1 実験材料

本試験に用いた薬物および試薬は、以下の通りである。

Tris-HCl (pH 8.0)、グリシン (glycine)、Block One-P、リン酸水素二ナトリウム・12水和物 (disodium hydrogenphosphate 12-water: $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、リン酸二水素ナトリウム二水和物 (sodium dihydrogenphosphate dehydrate: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、Triton X-100、ペントバルビタール (pentobarbital) はNacalai Tesque、proteinase K solutionはQiagen、ペンチレンテトラゾール、カイニン酸、酢酸アンモニウム (ammonium acetate)、protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail II、phosphatase inhibitor cocktail III、Igepal CA-630 はSigma Aldrich、diluted water、Sample Buffer Solution (2ME+) (x4)、メタノール (methanol)、イムノスター[®]LD、デオキシコール酸ナトリウム (sodium deoxycholate)、SDS、PFA、スクロース (sucrose)、塩化カリウム (potassium chloride : KCl)、はWako Pure Chemical Industries、BCA protein assay kit、はThermo Scientific、TBSはタカラバイオ株式会社、塩化ナトリウム (sodium chloride: NaCl)、水酸化ナトリウム (sodium hydroxide: NaOH) はKishida Chemical (Osaka, Japan) は東京化成工業株式会社、EDTA・2Na (disodium ethylenediamine tetraacetate) は株式会社同仁化学研究所、ブロックエース (Block ace) はDainippon Sumitomo Pharma、O.C.T. compoundはSakura Finetechnical (Tokyo, Japan)、ABC kit、DAB peroxidase substrate kitはVector

Labs、EUKITTはO.Kindler、Can get signal solution 1、Can get signal solution 2はToyobo、トリス塩基 (tris base) はBIO RADよりそれぞれ購入した。マウス由来抗DGK β 抗体は、神戸大学大学院農学研究科生命機能科学専攻教授 白井康仁博士より譲渡して頂いた。

2-2 実験方法

2-2-1 実験動物

DGK β 欠損マウスおよびその同腹仔である野生型マウスは第 1 章で示した動物を使用した。動物は自由給水下にて固形飼料 (CE-2) により飼育し、行動試験はすべて午前 10:00 から午後 6:00 の間に行った。すべての実験は岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に動物実験承認申請を行い、許可を受けた上で実施した。また、遺伝子組換え動物は、岐阜薬科大学生命倫理・バイオセーフティー委員会に遺伝子組換え実験申請を行い、許可を得て使用した。

2-2-2 薬物の調製および処置

ペンチレンテトラゾールは生理食塩水に溶解し、実験に使用した。カイニン酸はPBSに溶解し、実験に使用した。ペンチレンテトラゾール (60 mg/kg)、カイニン酸 (30 mg/kg)またはそれらの溶媒を 10 mL/kg の容量にて腹腔内より投与した。

2-2-3 ペンチレンテトラゾール誘発痙攣モデルにおける行動評価

ペンチレンテトラゾール (60 または 80 mg/kg) を腹腔内投与し、その直後から 30 分間の行動を観察した。マウスの行動はビデオカメラにより撮影し、1 分毎に以下に従いスコア化した (Itoh and Watanabe, 2009) (Fig. 28)。

スコア 0：異常なし

スコア 1：探索行動、嗅ぎ行動、毛づくろい行動の後、無動

スコア 2：嚙み行動、顔面や前肢までにとどまる短時間のミオクローヌス（四肢の収縮）

スコア 3：長時間のミオクローヌス（四肢の収縮）、反復性の頭部の運動あるいは身震い行動、尾部の硬直

スコア 4：前肢のみ、もしくは前後肢にわたる間代性痙攣、前肢を回転させるような発作、後肢の外転、持続的な立ち上がり行動、転倒、ストラウブ挙尾反応、カンガルー様姿勢

スコア 5：硬直痙攣

スコア 6：死亡

2-2-4 カイニン酸誘発痙攣モデルにおける行動評価

カイニン酸 (30 mg/kg) を腹腔内投与し、その直後から 60 分間の行動を観察した。マウスの行動はビデオカメラにより撮影し、5 分毎に以下に従いスコア化した (Guggenhuber et al., 2010)。

スコア 0：異常なし

スコア 1：動かない、どこかを見つめる



Fig. 28 Change of the seizure score.

スコア 2： 前肢または尻尾の伸展、硬直姿勢
スコア 3： 反復動作、頭をひょいひょい動かす
スコア 4： 立ち上がり行動、転倒
スコア 5： 繰り返しの立ち上がり行動、転倒
スコア 6： 重篤な強直間代発作
スコア 7： 死亡

2-2-5 組織免疫染色

2-2-5-1 組織切片作製

マウスはペントバルビタール麻酔下で開胸し、ペリスタポンプ (Atto) を用いて生理食塩水を左心室内に注入して灌流し、ついで 4% PFA 含有 0.1 M PB (pH 7.4) を 10 分間注入し固定した。その後、脳を取り出し、同固定液中に一晩放置した。固定した脳は 25% スクロース含有 0.1 M PB (pH 7.4) 液に 24 時間浸した後、液体窒素を用いて O.C.T. compound 中に凍結包埋し、クライオスタット (Leica, Tokyo, Japan) を用いて、-20°C で厚さ 14 μ m の切片を作製し、MAS コーティングされたスライドガラス (S-9441, Matsunami, Osaka, Japan) に貼付して、-80°C で保存した。

2-2-5-2 免疫染色

切片は、染色時に-80°Cより取り出し-20°Cで 1 時間放置した後、室温で 10 分間乾燥させ、0.01 M PBSに浸してO.C.T. compoundを洗浄した。その後、Super PAP pen (Daido sangyo) にて反応液の流出を防ぐために切片の周囲を囲んだ。DGK β タンパク質の染色においては、M.O.M. blocking reagent (M.O.M. imunodetection kit; Vector) にて 30 分間ブロッキングを行った後、抗DGK β 抗体 (1:200 dilution)

を用いて 4°C で 72 時間反応させた。その後、Alexa Fluor 546 F(ab')₂ fragment of anti-mouse IgG (H+L) (1:1,000 dilution: Molecular Probes, OR, USA) を 1 時間反応させ、Hoechst33342 (1:1,000 dilution: Invitrogen, Carlsbed, CA, USA) を用いて核の染色を行った。フルオロマウントおよびカバーガラスを用いて封入した後、キーエンス蛍光顕微鏡にて撮影を行った。

パルブアルブミンの染色においては、0.3% H₂O₂ 含有メタノールで 30 分間反応させた後、M.O.M. blocking reagent (M.O.M. imunodetection kit; Vector) で 30 時間ブロッキングした。ブロッキング後、抗パルブアルブミン抗体 (1:1,000 dilution: Millipore) を用いて 4°C で一晩反応させた。その後、biotinylated goat anti-mouse IgG (1:1,000 dilution: Vector) にて 20 分間反応させ、Vectastain Elite ABC Reagent で 30 分間反応させた後、DAB peroxidase substrate kit を用いて染色した。染色後、蒸留水で 2 分間 2 回洗浄し、70%、95%、99%、無水エタノールの順に 3 分間ずつ浸し脱水した。キシレンに 5 分間 2 回浸し透徹した後、EUKITT 試薬を用いてカバーガラスで封入した。切片はキーエンス蛍光顕微鏡にて撮影し、海馬におけるパルブアルブミン陽性細胞の数を算出した。

2-2-6 ウェスタンブロット解析

2-2-6-1 試料採取

ペンチレンテトラゾール (60 mg/kg) または溶媒の PBS を腹腔内投与し、20 分後にマウスを断頭した後、脳を摘出した。摘出した脳は、氷冷したガラスシャーレの上に置き、海馬を摘出し、顕微鏡下にて CA1、CA3 および歯状回 (dentate gyrus: DG) に切り分けた。組織は、マイクロチューブの中に入れ、急速冷凍した。

以降、第 2 章 2-2-7-1、2-2-7-2、2-2-7-3、2-2-7-4 の方法に準じて行った。

一次抗体には、抗 DGK β 抗体 (1:5,000 dilution)および monoclonal anti- β -actin (1:5,000 dilution; Sigma Aldrich) を用いた。二次抗体には、HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (1:2,000 dilution: Thermo Scientific) を用いた。

2-2-7 統計学的解析

実験成績は平均値 \pm 標準誤差 (SEM) で示した。統計学的な解析は JSTAT (Vector) を用いて行った。Student's t 検定または Fisher's exact test により統計解析を行い、危険率が 5%未満を有意差有りとした。

第3節 実験成績

3-1 ペンチレンテトラゾール投与後の野生型マウスおよびDGK β 欠損マウスの行動変化

薬物誘発痙攣モデルにおいて、DGK β 欠損マウスがどのような反応を示すかを検討するために、まず初めにペンチレンテトラゾールを用いてマウスにおいて痙攣を誘発した。ペンチレンテトラゾールはGABA_A受容体のアンタゴニストであり、強直性間代性痙攣をマウスにおいて引き起こす。60 mg/kgのペンチレンテトラゾールを投与後、すべてのマウスにおいて間代性痙攣 (スコア 4) またはそれ以上の重篤な痙攣が認められた (Table 1)。DGK β 欠損マウスの約半数において硬直性痙攣が認められたのに対し (スコア 5; 5/9)、野生型マウスにおいてはほとんどがスコア 4 の痙攣にとどまった (10 匹中 1 匹のマウスにおいてのみ、スコア 5 の痙攣が生じた)。80 mg/kgのペンチレンテトラゾール投与後では、野生型マウスではスコア 4 以上の痙攣が認められたマウスは5匹中1匹であったのに対し、DGK β 欠損マウスでは5匹中4匹のマウスにおいてスコア 4 以上の痙攣が認められた。

Table 1 Occurrence of various seizure after pentylenetetrazol (PTZ) treatment in WT and DGK β KO mice.

PTZ (mg/kg, i.p.)	60		80	
Genotypes	WT	KO	WT	KO
n	10	9	5	5
Score 4 (clonic convulsion)	10 (100%)	9 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
Score 5 (tonic convulsion)	1 (10%)	5 (56%)	1 (20%)	4 (80%)
Score 6 (death)	0	1 (11%)	1 (20%)	4 (80%)

PTZ: pentylenetetrazol, WT: wild-type mice, KO: knock-out mice

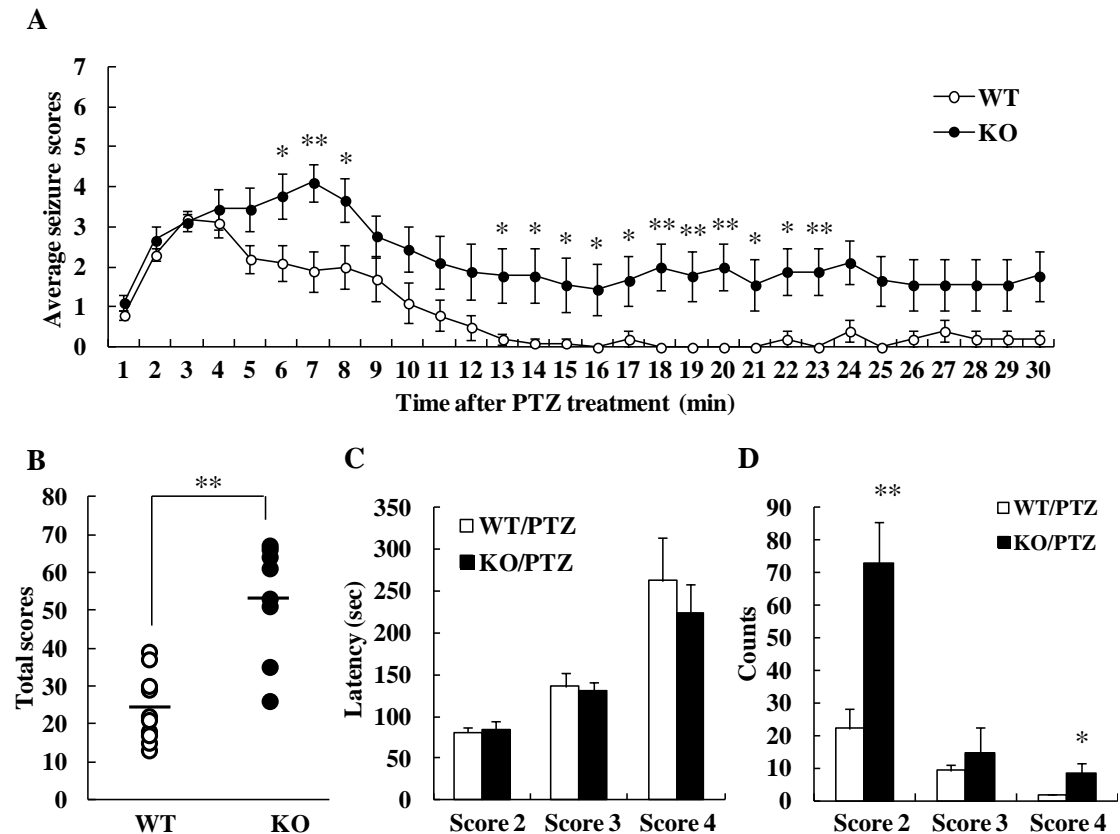


Fig. 29 Behavioral changes in DGK β KO mice after pentylenetetrazol (PTZ) treatment.

(A) Mean seizure scores per one minute, (B) total seizure scores, (C) latency to reach a given seizure score, and (D) number of occurrences of a given seizure score, in WT and DGK β KO mice after PTZ (60 mg/kg, i.p.) treatment. Values are expressed as the mean \pm SEM. (WT, $n = 10$; KO, $n = 9$) * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. WT mice (Student's t -test).

経時的な痙攣スコアの変化の検討を行ったところ、野生型マウスにおいては痙攣スコアは投与 5 分後に最大となり、その後徐々に低下した (Fig. 29A)。一方、DGK β 欠損マウスの痙攣スコアは高いままであった。30 分間の観察中において、痙攣スコアの合計値は野生型マウスに比べ、DGK β 欠損マウスでは有意に大きかった (Fig. 29B)。しかしながら、スコア 2、3、4 の痙攣に達するまでの潜時においては野生型マウスと DGK β 欠損マウスにおいて有意差は認められなかった (Fig. 29C)。30 分間の観察におけるスコア 2、3、4 の痙攣の発生回数を検討したところ、スコア 2 および 4 の痙攣の発生回数が DGK β 欠損マウスにおいて有意に増大していた (Fig. 29D)。

3-2 カイニン酸投与後の野生型マウスおよび DGK β 欠損マウスの行動変化

つぎに、DGK β 欠損マウスが他の薬剤誘発痙攣モデルにおいても感受性の増大を示すか否かについて検討するため、カイニン酸を用いて評価した。カイニン酸はカイニン酸型グルタミン酸受容体のアゴニストであり、興奮毒性による神経細胞死の研究および痙攣の研究において広く用いられている。

野生型マウスにおいては、痙攣のレベルは徐々に増大し、薬物投与 40 分後にスコア 3 の痙攣に達した (Fig. 30A)。DGK β 欠損マウスにおいても、行動の経時

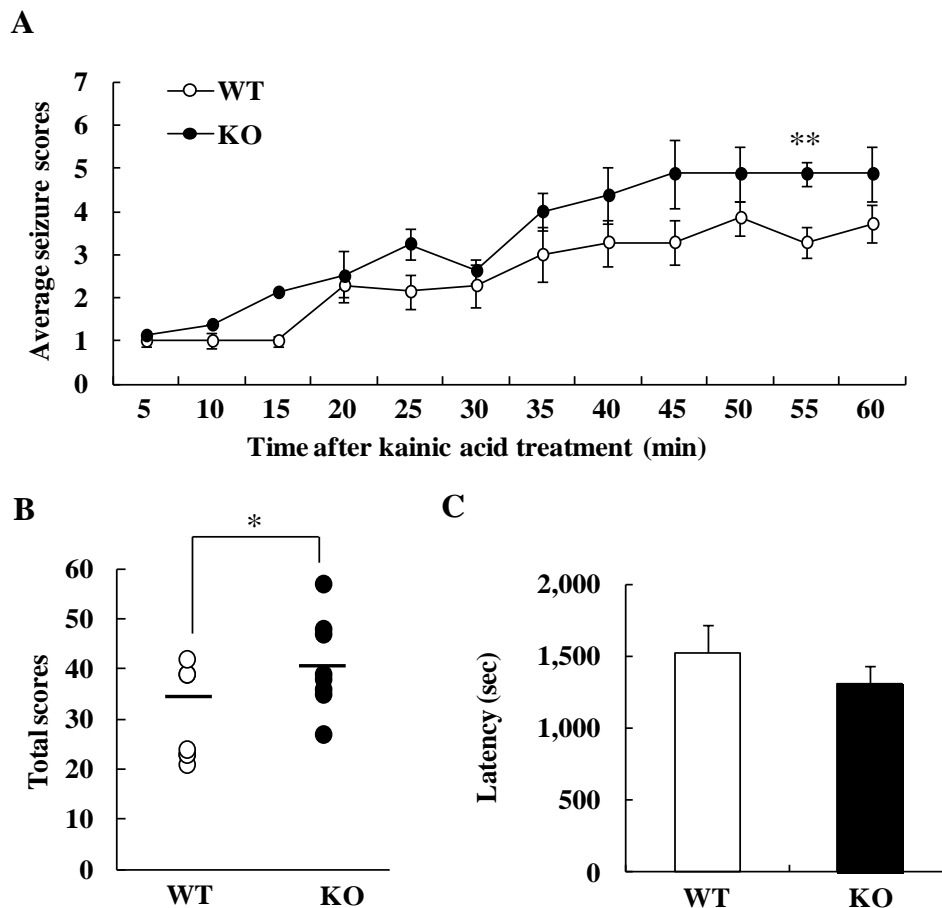


Fig. 30 Behavioral changes in diacylglycerol kinase β (DGK β) knockout (KO) mice after kainic acid treatment.

(A) Mean seizure scores per five minute, (B) total seizure scores, and (C) latency to reach a given seizure score, in WT and DGK β KO mice after kainic acid (30 mg/kg, i.p.) treatment. Values are expressed as the mean \pm SEM (WT, $n = 7$; KO, $n = 8$) * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. WT mice (Student's t -test).

的な変化においては同じようなパターンが認められたが、どのタイムポイントにおいても野生型マウスに比べて痙攣スコアは高値を示した (Fig. 30A)。60 分間における痙攣スコアの合計値は、DGK β 欠損マウスにおいて有意な増加が認められた (Fig. 30B)。しかしながら、スコア3の痙攣に達するまでの潜時において、両群間において明らかな差は認められなかった (Fig. 30C)。

3-3 ペンチレンテトラゾール投与後の DGK β の発現量および局在に関する検討

これまでの一過性脳虚血動物モデルを用いた研究において、DGK ζ は海馬神経細胞において、ストレスに応答して核から細胞質へ速やかに移行することが示されている (Ali et al., 2004)。また、興奮性の刺激を受けると、DGK ζ は核から細胞質へ移行し、その後細胞質でのユビキチン-プロテアソームシステムにより分解されることが知られている (Okada et al., 2012)。そこで、DGK β についても、ペンチレンテトラゾール投与により引き起こされる興奮性の刺激によりその局在または発現量に変化が生じるか否かについて野生型マウスを用いて検討した。Fig 31 に示す、海馬 CA1、CA3 および DG の3 部位に関して検討した。

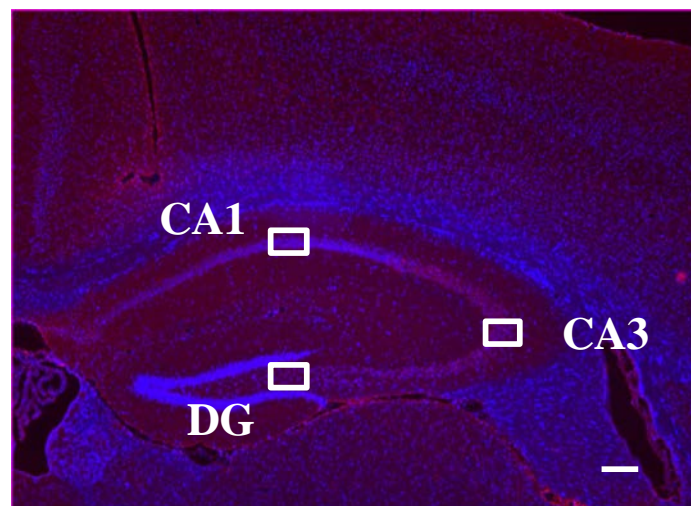


Fig. 31 Region of the hippocampus of mice.

Hippocampus were classified into CA1 region, CA3 region, and dentate gyrus (DG). Red stains DGK β and blue stains nuclear with Hoechst33342. Scale bar = 200 μ m.

ペンチレンテトラゾール投与 20 分後における海馬の DGK β の局在を免疫染色法を用いて検討したが、生理食塩水投与群と比べ、DGK β の分布に有意な変化は認められなかった (Fig. 32A)。また、ペンチレンテトラゾール投与後の DGK β タンパク質の発現量に関する検討をウェスタンブロット法を用いて検討したが、海馬 CA1、CA3 および DG の 3 つの部位において明らかな変化は認められなかった (Fig. 32B)。

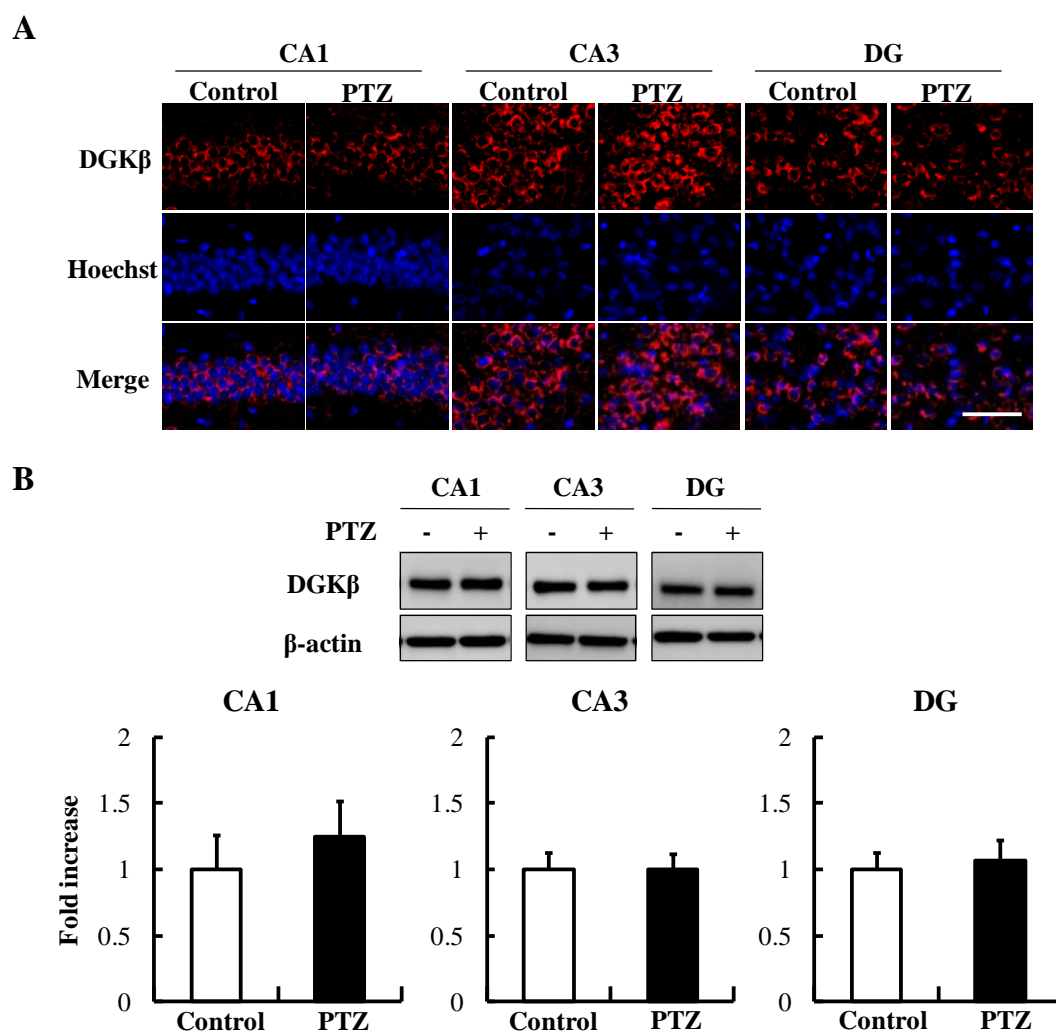


Fig. 32 The expression levels and localization of DGK β after pentylenetetrazol (PTZ) injection.

(A) Immunostaining for DGK β 20 min after PTZ (60 mg/kg, i.p.) treatment. Hippocampal CA1, CA3, and dentate gyrus (DG) areas were analyzed. Red stains DGK β and blue stains nuclear with Hoechst33342. Scale bar = 50 μ m. (B) Western blot analysis for DGK β 20 min after PTZ (60 mg/kg, i.p.) treatment. Protein levels of DGK β was quantified relative to the β -actin levels. Values are expressed as the mean \pm SEM. (n = 5).

3-4 野生型マウスおよび DGK β 欠損マウスの海馬における抑制性神経細胞数の検討

介在性ニューロンは神経細胞の興奮の制御において重要な役割を示しており、抑制性介在ニューロンと興奮性ニューロンのバランスの乱れは諸種病態に関与している (Marco et al., 1997; Wang et al., 2011; Zhu et al., 1997)。実際、抑制性介在ニューロン数の減少は痙攣感受性の増大と密接に関連している (Gant et al., 2009)。DGK β 欠損マウスの痙攣感受性の増大に、この抑制性介在ニューロン数の減少が関与している可能性が考えられるため、海馬におけるパルブアルブミンにより染色される抑制性介在ニューロンの数を検討した。DGK β 欠損マウスの海馬 CA3 領域において、パルブアルブミン陽性の抑制性介在ニューロンの数が野生型マウスに比べて減少していた (Fig. 33A, B)。しかしながら、海馬 CA1 領域や DG においては野生型マウスおよび DGK β 欠損マウスの間に明らかな差は認められなかった (Fig.33B)。

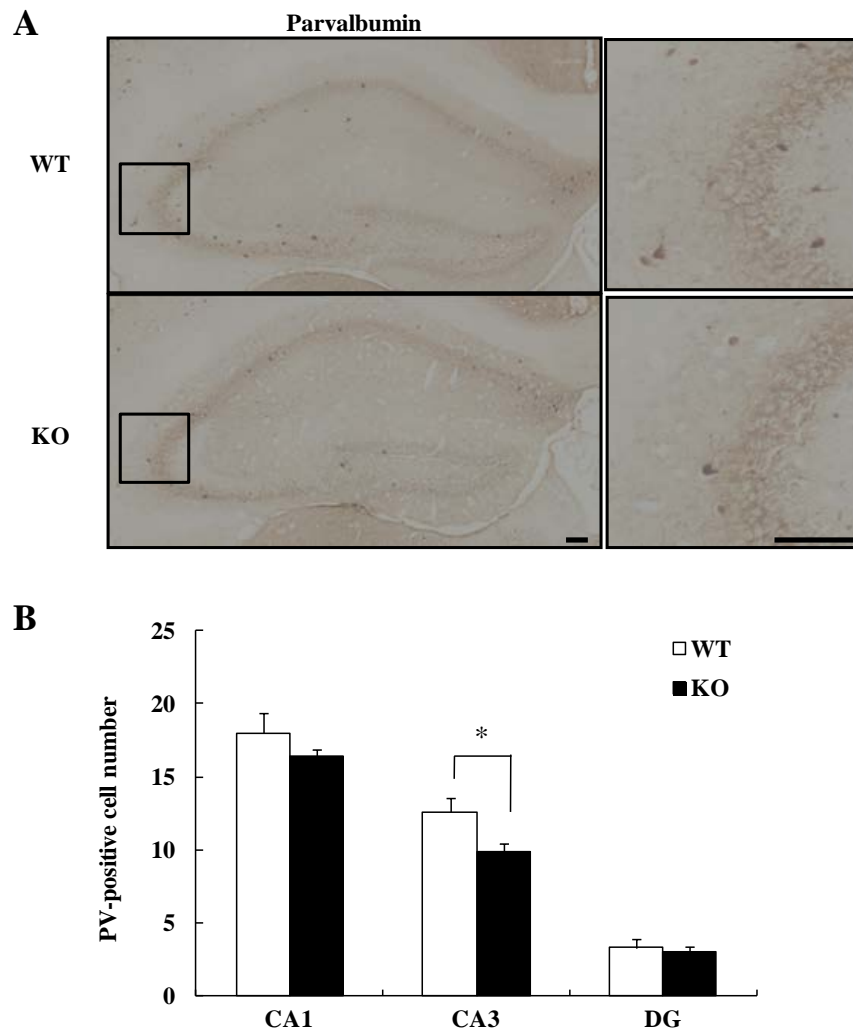


Fig. 33 Parvalbumin-positive interneurons in hippocampal subregions.

(A) Immunostaining for parvalbumin in the hippocampus of age-matched WT and DGK β KO mice. Right panels show enlargements of the hippocampal CA3 region (shown by the box in the corresponding left panel). Scale bars = 100 μ m. (B) Parvalbumin-positive cell numbers in the hippocampal subregions in WT and DGK β KO mice. Values are expressed as the mean \pm SEM. (WT, n = 6; KO, n = 5) * p < 0.05 vs. WT mice (Student's t -test).

第4節 考察

これまでの研究から、DGK β の脳内における局在が徐々に明らかとなってきた。DGK β の発現は神経細胞に局在しており、先に述べたようにその発現は嗅球、海馬、大脳皮質、線条体に認められている (Goto and Kondo, 1993; Shirai et al., 2010)。海馬においては、CA1、CA2、CA3 の上昇層および放線状層において発現しており、投射ニューロンだけでなく、介在ニューロンにおいても発現していることが明らかとなっている (Hozumi et al., 2009)。

本研究において、DGK β 欠損マウスは薬物誘発性痙攣に対して野生型マウスに対してより重篤な症状を示した。そのため、痙攣時のマウス海馬における DGK β の局在と発現量に関して検討した。過去の検討において、痙攣への関与が示唆されている DGK ϵ は痙攣時には局在や発現量に変化は認められないが、DGK ϵ 欠損マウスではアラキドン酸代謝の異常により痙攣症状が緩和されることが報告されている (Musto and Bazan, 2006)。一方、DGK ζ は痙攣発作時には核から細胞質へ移行すること、また、DGK ζ 欠損マウスは薬物誘発性痙攣に対して感受性の増大を示すことが明らかとなっている (Okada et al., 2012)。本研究においては、ペンチレンテトラゾール投与後においても DGK β の発現様式には変化は認められず、その発現は細胞表面にとどまっていたことから、DGK β はマウスにおいて痙攣発作時には応答しないタンパク質である可能性が示唆された。

海馬における介在ニューロンは GABA を発現する非主要ニューロンであり、海馬各部位における様々な種類の GABA 作動性介在ニューロンから主要ニューロンへの抑制性の入力神経ネットワークの維持に必要不可欠である (Freund and Buzsaki, 1996)。カルシウム結合性タンパク質であるパルブアルブミン陽性の介在ニューロンは海馬の神経ネットワークオシレーションの同期を助ける役割を果たしている (Klausberger et al., 2005)。さらに、パルブアルブミン陽性神経細

胞の減少は、痙攣感受性の増大を引き起こすことが知られている (Andrioli et al., 2007; Gant et al., 2009; Kuruba et al., 2011; Schwaller et al., 2004)。DGK β 欠損マウスの海馬 CA3 領域において、パルブアルブミン陽性細胞数の減少が認められ、この減少が DGK β 欠損マウスにおける痙攣感受性の増大の要因であると考えられる。興味深いことに、双極性障害患者の海馬においては、パルブアルブミン陽性介在ニューロン数の減少が報告されている (Konradi et al., 2011; Pantazopoulos et al., 2007; Wang et al., 2011)。これまでの研究において、筆者らは DGK β 欠損マウスが躁病様の行動異常を示すこと明らかにした (Kakefuda et al., 2010)。また、双極性障害患者においては DGK β の COOH 末端のスプライスバリエントが報告されている (Caricasole et al., 2002)。ラットの脳においては、DGK β タンパク質の発現量は生後 7 日目にわずかに確認され、生後 14 日、28 日の間に急速に増大する (Adachi et al., 2005)。DGK β タンパク質の発現量増大の時期と同時期に、パルブアルブミン mRNA は皮質および海馬において認められる (de Lecea et al., 1995)。これらの知見から、DGK β がパルブアルブミン陽性介在ニューロンの発達に関与している可能性が考えられる。

本研究より、DGK β 欠損マウスにおいては痙攣感受性の増大が認められ、その一因として海馬 CA3 領域におけるパルブアルブミン陽性介在ニューロンの減少が考えられる。これらの結果より、DGK β が介在ニューロン等の発達において重要な役割を示している可能性が示唆された。

総括および結論

精神疾患とは、外因性あるいは内因性のストレス等による脳の機能的・器質的な障害のことであり、その患者数は増加の一途をたどっている。主に精神疾患には、統合失調症、うつ病や双極性障害の他、てんかんの一部やアルツハイマー病等の精神症状を伴う神経変性疾患も含まれることが多い。いずれの疾患も、環境的な要因や遺伝的な要因が複雑に影響しており、その病態は未だに不明な点が多い。

双極性障害患者の一部において、DGK β の COOH 末端のスプライスバリエントが確認されており、これまでの検討において、DGK β 欠損マウスが過活動、不安レベルの低下、抑うつ行動の減少、認知機能の低下等の双極性障害の特に躁状態に類似した表現型を示すことを明らかにしている。また、DGK β 欠損マウスの過活動や不安レベルの低下は気分安定薬であるリチウム塩により改善される。

本研究では、DGK β 欠損マウスのさらなる表現型解析を目的として研究を実施した。すなわち、既存の双極性障害治療薬による DGK β 欠損マウスの異常行動改善に関する検討、ADHD 病態に関連した表現型の検討および痙攣感受性の検討を行った。

第1章では、DGK β 欠損マウスを用いて、自発活動量、不安行動および認知機能に対するバルプロ酸とオランザピンの作用を検討した。

- 1) バルプロ酸およびオランザピンの単回投与は、DGK β 欠損マウスにおいて認められる過活動および不安レベルの減少に対して明らかな作用を示さなかった。
- 2) バルプロ酸およびオランザピンの慢性投与は、DGK β 欠損マウスにおいて認められる過活動および不安レベルの減少を有意に改善した。
- 3) DGK β 欠損マウスにおいて認められる認知機能の低下は、バルプロ酸の慢性

投与により改善された。

第2章では、DGK β 欠損マウスの注意欠損様の表現型の検出と精神刺激薬投与後の行動変化について検討を行った。

- 1) DGK β 欠損マウスは、注意欠損様の行動が認められ、ADHD 治療薬メチルフェニデートの投与により改善された。
- 2) メチルフェニデート投与後、野生型マウスにおいて自発活動量の亢進が認められるが、DGK β 欠損マウスは低反応性を示した。
- 3) メチルフェニデート投与により、DGK β 欠損マウスにおいて認められた立ち上がり行動の増加は減少した。
- 4) NMDA 受容体アンタゴニストである MK-801 の投与は、DGK β 欠損マウスにおいて野生型マウスと同様に自発活動量の亢進が認められた。
- 5) DGK β 欠損マウスにおいて線条体ドパミン量は増加しているが、ドパミン合成酵素、ドパミン受容体の発現量およびドパミン受容体の機能において異常は認められなかった。
- 6) DGK β 欠損マウスの線条体において、メチルフェニデート投与後にリン酸化 ERK1/2 の発現量増大は認められなかった。

第3章では、DGK β 欠損マウスの薬物誘発痙攣に対する感受性の検討を行った。

- 1) DGK β 欠損マウスは野生型マウスに比べて、ペンチレンテトラゾール誘発痙攣において痙攣に対する易感受性が認められた。
- 2) DGK β 欠損マウスは野生型マウスに比べて、カイニン酸誘発痙攣において痙攣に対する易感受性が認められた。
- 4) DGK β 欠損マウスの海馬 CA3 領域では、パルブアルブミン陽性の抑制性介在

ニューロン数が減少していた。

本研究において、DGK β 欠損マウスにおいて認められる躁病様の表現型はリチウム塩だけでなく、バルプロ酸およびオランザピン等の他の既存治療薬によって改善されることが明らかとなり、これはモデル動物の予測妥当性を満たす結果であり、DGK β 欠損マウスの双極性障害躁状態のモデル動物としての有用性をより高めるものである。また、DGK β 欠損マウスは注意欠損様の行動を示し、メチルフェニデートにより改善されることから、ADHD モデル動物になりうる可能性も考えられる。また、DGK β 欠損マウスの線条体におけるドパミンシステムに異常は認められないものの、メチルフェニデート投与後の行動変化やリン酸化 ERK1/2 発現量の変化においては特徴的な変化が認められ、シグナル伝達において DGK β が ADHD 病態に何らかの重要な役割を示す可能性が考えられる。さらに、DGK β 欠損マウスでは痙攣感受性の増大が認められ、海馬 CA3 領域における抑制介在ニューロンの減少が認められたことから、神経発達における DGK β の関与も示唆された。

以上、DGK β は高次脳機能の制御機構において重要な役割を果たしており、DGK β 欠損マウスは双極性障害をはじめとする精神疾患のモデル動物として有用であると考えられる。また、DGK β 欠損マウスを用いたさらなる病態の解明や DGK β 関連シグナルの制御をターゲットとした精神疾患に対する新規治療薬の開発が期待できる。

謝 辞

本稿を終えるに臨み、本研究の遂行にあたり終始御懇篤なる御指導、ご鞭撻を賜りました恩師岐阜薬科大学学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室教授 原英彰博士に深甚なる謝意を表します。

本研究に際して終始御懇切なる御指導ならびに御助言を賜りました岐阜薬科大学学生体機能解析学大講座薬効解析学研究室准教授 嶋澤雅光博士および助教 鶴間一寛博士に深謝いたします。また、諸種の御協力を頂きました薬効解析学研究室研究室諸氏に心から感謝致します。

本論文の審査にあたり、有益なる御助言を賜りました岐阜薬科大学学生体機能解析学大講座分子生物学研究室教授 古川昭栄博士、岐阜薬科大学医療薬剤学大講座薬物治療学研究室教授 保住功博士並びに岐阜薬科大学生命薬学大講座生化学研究室教授 五十里彰博士に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、実験材料の御提供、御助言並びに御協力を賜りました神戸大学大学院農学研究科生命機能科学専攻教授 白井康仁博士、神戸大学バイオシグナル研究センター神経情報伝達分野教授 齋藤尚亮博士、岐阜薬科大学医療薬剤学大講座薬物動態学研究室教授 北市清幸博士に心から感謝の意を表します。

引用文献

Adachi, N., Oyasu, M., Taniguchi, T., Yamaguchi, Y., Takenaka, R., Shirai, Y., Saito, N., 2005. Immunocytochemical localization of a neuron-specific diacylglycerol kinase beta and gamma in the developing rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 139, 288-299.

Ali, H., Nakano, T., Saino-Saito, S., Hozumi, Y., Katagiri, Y., Kamii, H., Sato, S., Kayama, T., Kondo, H., Goto, K., 2004. Selective translocation of diacylglycerol kinase zeta in hippocampal neurons under transient forebrain ischemia. *Neuroscience letters* 372, 190-195.

Alkam, T., Hiramatsu, M., Mamiya, T., Aoyama, Y., Nitta, A., Yamada, K., Kim, H.C., Nabeshima, T., 2011. Evaluation of object-based attention in mice. *Behavioural brain research* 220, 185-193.

Andrioli, A., Alonso-Nanclares, L., Arellano, J.I., DeFelipe, J., 2007. Quantitative analysis of parvalbumin-immunoreactive cells in the human epileptic hippocampus. *Neuroscience* 149, 131-143.

Aubry, J.M., Schwald, M., Ballmann, E., Karege, F., 2009. Early effects of mood stabilizers on the Akt/GSK-3beta signaling pathway and on cell survival and proliferation. *Psychopharmacology* 205, 419-429.

Barbosa, F.J., Hesse, B., de Almeida, R.B., Baretta, I.P., Boerngen-Lacerda, R., Andreatini, R., 2011. Magnesium sulfate and sodium valproate block methylphenidate-induced hyperlocomotion, an animal model of mania. *Pharmacol Rep* 63, 64-70.

Bari, A., Dalley, J.W., Robbins, T.W., 2008. The application of the 5-choice serial reaction time task for the assessment of visual attentional processes and impulse control in rats. *Nature protocols* 3, 759-767.

Baum, A.E., Akula, N., Cabanero, M., Cardona, I., Corona, W., Klemens, B., Schulze, T.G., Cichon, S., Rietschel, M., Nothen, M.M., Georgi, A., Schumacher, J., Schwarz, M., Abou Jamra, R., Hofels, S., Propping, P., Satagopan, J., Detera-Wadleigh, S.D., Hardy, J., McMahon, F.J., 2008. A genome-wide association study implicates diacylglycerol kinase eta (DGKH) and several other genes in the etiology of bipolar disorder.

Molecular psychiatry 13, 197-207.

Beaulieu, J.M., Sotnikova, T.D., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., 2006. Paradoxical striatal cellular signaling responses to psychostimulants in hyperactive mice. *The Journal of biological chemistry* 281, 32072-32080.

Beaulieu, J.M., Sotnikova, T.D., Marion, S., Lefkowitz, R.J., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., 2005. An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell* 122, 261-273.

Beaulieu, J.M., Sotnikova, T.D., Yao, W.D., Kockeritz, L., Woodgett, J.R., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., 2004. Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 5099-5104.

Caricasole, A., Bettini, E., Sala, C., Roncarati, R., Kobayashi, N., Caldara, F., Goto, K., Terstappen, G.C., 2002. Molecular cloning and characterization of the human diacylglycerol kinase beta (DGKbeta) gene: alternative splicing generates DGKbeta isoforms with different properties. *The Journal of biological chemistry* 277, 4790-4796.

Carlsson, M., Carlsson, A., 1989. The NMDA antagonist MK-801 causes marked locomotor stimulation in monoamine-depleted mice. *Journal of neural transmission* 75, 221-226.

Christakis, D.A., Ramirez, J.S., Ramirez, J.M., 2012. Overstimulation of newborn mice leads to behavioral differences and deficits in cognitive performance. *Scientific reports* 2, 546.

Craddock, N., Jones, I., 1999. Genetics of bipolar disorder. *Journal of medical genetics* 36, 585-594.

de Lecea, L., del Rio, J.A., Soriano, E., 1995. Developmental expression of parvalbumin mRNA in the cerebral cortex and hippocampus of the rat. *Brain research* 32, 1-13.

El-Mallakh, R.S., Decker, S., Morris, M., Li, X.P., Huff, M.O., El-Masri, M.A., Levy, R.S., 2006. Efficacy of olanzapine and haloperidol in an animal model of mania. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 30, 1261-1264.

Fienberg, A.A., Hiroi, N., Mermelstein, P.G., Song, W., Snyder, G.L., Nishi, A., Cheramy, A., O'Callaghan, J.P., Miller, D.B., Cole, D.G., Corbett, R., Haile, C.N., Cooper, D.C., Onn, S.P., Grace, A.A., Ouimet, C.C., White, F.J., Hyman, S.E., Surmeier, D.J., Girault, J., Nestler, E.J., Greengard, P., 1998. DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science* (New York, N.Y. 281, 838-842.

Freund, T.F., Buzsaki, G., 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6, 347-470.

Frey, B.N., Andreazza, A.C., Cereser, K.M., Martins, M.R., Valvassori, S.S., Reus, G.Z., Quevedo, J., Kapczinski, F., 2006. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life sciences* 79, 281-286.

Gainetdinov, R.R., Mohn, A.R., Bohn, L.M., Caron, M.G., 2001. Glutamatergic modulation of hyperactivity in mice lacking the dopamine transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 11047-11054.

Gant, J.C., Thibault, O., Blalock, E.M., Yang, J., Bachstetter, A., Kotick, J., Schauwecker, P.E., Hauser, K.F., Smith, G.M., Mervis, R., Li, Y., Barnes, G.N., 2009. Decreased number of interneurons and increased seizures in neuropilin 2 deficient mice: implications for autism and epilepsy. *Epilepsia* 50, 629-645.

Ghosh, S., Strum, J.C., Sciorra, V.A., Daniel, L., Bell, R.M., 1996. Raf-1 kinase possesses distinct binding domains for phosphatidylserine and phosphatidic acid. Phosphatidic acid regulates the translocation of Raf-1 in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated Madin-Darby canine kidney cells. *The Journal of biological chemistry* 271, 8472-8480.

Goto, K., Hozumi, Y., Nakano, T., Saino, S.S., Kondo, H., 2007. Cell biology and pathophysiology of the diacylglycerol kinase family: morphological aspects in tissues and organs. *International review of cytology* 264, 25-63.

Goto, K., Kondo, H., 1993. Molecular cloning and expression of a 90-kDa diacylglycerol kinase that predominantly localizes in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 7598-7602.

Greengard, P., Allen, P.B., Nairn, A.C., 1999. Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron* 23, 435-447.

Guggenhuber, S., Monory, K., Lutz, B., Klugmann, M., 2010. AAV vector-mediated overexpression of CB1 cannabinoid receptor in pyramidal neurons of the hippocampus protects against seizure-induced excitotoxicity. *PLoS one* 5, e15707.

Han, K., Holder, J.L., Jr., Schaaf, C.P., Lu, H., Chen, H., Kang, H., Tang, J., Wu, Z., Hao, S., Cheung, S.W., Yu, P., Sun, H., Breman, A.M., Patel, A., Lu, H.C., Zoghbi, H.Y., 2013. SHANK3 overexpression causes manic-like behaviour with unique pharmacogenetic properties. *Nature* 503, 72-77.

Hoertel, N., de Maricourt, P., Gorwood, P., 2013. Novel routes to bipolar disorder drug discovery. *Expert opinion on drug discovery* 8, 907-918.

Hozumi, Y., Fukaya, M., Adachi, N., Saito, N., Otani, K., Kondo, H., Watanabe, M., Goto, K., 2008. Diacylglycerol kinase beta accumulates on the perisynaptic site of medium spiny neurons in the striatum. *The European journal of neuroscience* 28, 2409-2422.

Hozumi, Y., Watanabe, M., Otani, K., Goto, K., 2009. Diacylglycerol kinase beta promotes dendritic outgrowth and spine maturation in developing hippocampal neurons. *BMC neuroscience* 10, 99.

Huang, M., Li, Z., Ichikawa, J., Dai, J., Meltzer, H.Y., 2006. Effects of divalproex and atypical antipsychotic drugs on dopamine and acetylcholine efflux in rat hippocampus and prefrontal cortex. *Brain research* 1099, 44-55.

Ishisaka, M., Hara, H., 2014. The roles of diacylglycerol kinases in the central nervous system: review of genetic studies in mice. *Journal of pharmacological sciences* 124, 336-343.

Itoh, K., Watanabe, M., 2009. Paradoxical facilitation of pentylenetetrazole-induced convulsion susceptibility in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Neuroscience* 159, 735-743.

Takefuda, K., Oyagi, A., Ishisaka, M., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Yokota, K., Shirai, Y., Horie, K., Saito, N., Takeda, J., Hara, H., 2010. Diacylglycerol kinase beta knockout mice exhibit lithium-sensitive behavioral abnormalities. *PLoS one* 5, e13447.

Kanoh, H., Yamada, K., Sakane, F., 1990. Diacylglycerol kinase: a key modulator of signal transduction? *Trends in biochemical sciences* 15, 47-50.

- Kiguchi, M., Fujita, S., Oki, H., Shimizu, N., Cools, A.R., Koshikawa, N., 2008. Behavioural characterisation of rats exposed neonatally to bisphenol-A: responses to a novel environment and to methylphenidate challenge in a putative model of attention-deficit hyperactivity disorder. *Journal of neural transmission* 115, 1079-1085.
- Kirshenbaum, G.S., Clapcote, S.J., Duffy, S., Burgess, C.R., Petersen, J., Jarowek, K.J., Yucel, Y.H., Cortez, M.A., Snead, O.C., 3rd, Vilsen, B., Peever, J.H., Ralph, M.R., Roder, J.C., 2012. Mania-like behavior induced by genetic dysfunction of the neuron-specific Na⁺,K⁺-ATPase alpha3 sodium pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 18144-18149.
- Klausberger, T., Marton, L.F., O'Neill, J., Huck, J.H., Dalezios, Y., Fuentealba, P., Suen, W.Y., Papp, E., Kaneko, T., Watanabe, M., Csicsvari, J., Somogyi, P., 2005. Complementary roles of cholecystokinin- and parvalbumin-expressing GABAergic neurons in hippocampal network oscillations. *J Neurosci* 25, 9782-9793.
- Konradi, C., Zimmerman, E.I., Yang, C.K., Lohmann, K.M., Gresch, P., Pantazopoulos, H., Berretta, S., Heckers, S., 2011. Hippocampal interneurons in bipolar disorder. *Archives of general psychiatry* 68, 340-350.
- Krapacher, F.A., Mlewski, E.C., Ferreras, S., Pisano, V., Paolorossi, M., Hansen, C., Paglini, G., 2010. Mice lacking p35 display hyperactivity and paradoxical response to psychostimulants. *Journal of neurochemistry* 114, 203-214.
- Kuruba, R., Hattiangady, B., Parihar, V.K., Shuai, B., Shetty, A.K., 2011. Differential susceptibility of interneurons expressing neuropeptide Y or parvalbumin in the aged hippocampus to acute seizure activity. *PLoS one* 6, e24493.
- Li, X., Bijur, G.N., Jope, R.S., 2002. Glycogen synthase kinase-3beta, mood stabilizers, and neuroprotection. *Bipolar disorders* 4, 137-144.
- Machado-Vieira, R., Kapczinski, F., Soares, J.C., 2004. Perspectives for the development of animal models of bipolar disorder. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 28, 209-224.
- Marco, P., Sola, R.G., Ramon y Cajal, S., DeFelipe, J., 1997. Loss of inhibitory synapses on the soma and axon initial segment of pyramidal cells in human epileptic peritumoural neocortex: implications for epilepsy. *Brain research bulletin* 44, 47-66.

- McOmish, C.E., Lira, A., Hanks, J.B., Gingrich, J.A., 2012. Clozapine-induced locomotor suppression is mediated by 5-HT_{2A} receptors in the forebrain. *Neuropsychopharmacology* 37, 2747-2755.
- Merida, I., Avila-Flores, A., Merino, E., 2008. Diacylglycerol kinases: at the hub of cell signalling. *The Biochemical journal* 409, 1-18.
- Moya, P.R., Murphy, D.L., McMahon, F.J., Wendland, J.R., 2010. Increased gene expression of diacylglycerol kinase ϵ in bipolar disorder. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)* 13, 1127-1128.
- Musto, A., Bazan, N.G., 2006. Diacylglycerol kinase ϵ modulates rapid kindling epileptogenesis. *Epilepsia* 47, 267-276.
- Nierenberg, A.A., Miyahara, S., Spencer, T., Wisniewski, S.R., Otto, M.W., Simon, N., Pollack, M.H., Ostacher, M.J., Yan, L., Siegel, R., Sachs, G.S., 2005. Clinical and diagnostic implications of lifetime attention-deficit/hyperactivity disorder comorbidity in adults with bipolar disorder: data from the first 1000 STEP-BD participants. *Biological psychiatry* 57, 1467-1473.
- Nishizuka, Y., 1995. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *Faseb J* 9, 484-496.
- O'Brien, W.T., Harper, A.D., Jove, F., Woodgett, J.R., Maretto, S., Piccolo, S., Klein, P.S., 2004. Glycogen synthase kinase-3 β haploinsufficiency mimics the behavioral and molecular effects of lithium. *J Neurosci* 24, 6791-6798.
- O'Brien, W.T., Huang, J., Buccafusca, R., Garskof, J., Valvezan, A.J., Berry, G.T., Klein, P.S., 2011. Glycogen synthase kinase-3 is essential for beta-arrestin-2 complex formation and lithium-sensitive behaviors in mice. *The Journal of clinical investigation* 121, 3756-3762.
- Okada, M., Hozumi, Y., Tanaka, T., Suzuki, Y., Yanagida, M., Araki, Y., Evangelisti, C., Yagisawa, H., Topham, M.K., Martelli, A.M., Goto, K., 2012. DGK ζ is degraded through the cytoplasmic ubiquitin-proteasome system under excitotoxic conditions, which causes neuronal apoptosis because of aberrant cell cycle reentry. *Cellular signalling* 24, 1573-1582.

Ong, J.C., Brody, S.A., Large, C.H., Geyer, M.A., 2005. An investigation of the efficacy of mood stabilizers in rodent models of prepulse inhibition. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 315, 1163-1171.

Oyagi, A., Oida, Y., Kakefuda, K., Shimazawa, M., Shioda, N., Moriguchi, S., Kitaichi, K., Nanba, D., Yamaguchi, K., Furuta, Y., Fukunaga, K., Higashiyama, S., Hara, H., 2009. Generation and characterization of conditional heparin-binding EGF-like growth factor knockout mice. *PLoS one* 4, e7461.

Pantazopoulos, H., Lange, N., Baldessarini, R.J., Berretta, S., 2007. Parvalbumin neurons in the entorhinal cortex of subjects diagnosed with bipolar disorder or schizophrenia. *Biological psychiatry* 61, 640-652.

Park, S.W., Shen, X., Tien, L.T., Roman, R., Ma, T., 2011. Methamphetamine-induced changes in the striatal dopamine pathway in mu-opioid receptor knockout mice. *Journal of biomedical science* 18, 83.

Prickaerts, J., Moechars, D., Cryns, K., Lenaerts, I., van Craenendonck, H., Goris, I., Daneels, G., Bouwknecht, J.A., Steckler, T., 2006. Transgenic mice overexpressing glycogen synthase kinase 3 β : a putative model of hyperactivity and mania. *J Neurosci* 26, 9022-9029.

Regier, D.S., Higbee, J., Lund, K.M., Sakane, F., Prescott, S.M., Topham, M.K., 2005. Diacylglycerol kinase ι regulates Ras guanyl-releasing protein 3 and inhibits Rap1 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 7595-7600.

Reich, W., Neuman, R.J., Volk, H.E., Joyner, C.A., Todd, R.D., 2005. Comorbidity between ADHD and symptoms of bipolar disorder in a community sample of children and adolescents. *Twin Res Hum Genet* 8, 459-466.

Reid, C.A., Berkovic, S.F., Petrou, S., 2009. Mechanisms of human inherited epilepsies. *Progress in neurobiology* 87, 41-57.

Rezin, G.T., Furlanetto, C.B., Scaini, G., Valvassori, S.S., Goncalves, C.L., Ferreira, G.K., Jeremias, I.C., Resende, W.R., Cardoso, M.R., Varela, R.B., Quevedo, J., Streck, E.L., 2014. Fenproporex increases locomotor activity and alters energy metabolism, and mood stabilizers reverse these changes: a proposal for a new animal model of mania. *Molecular neurobiology* 49, 877-892.

- Rhee, S.G., Bae, Y.S., 1997. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *The Journal of biological chemistry* 272, 15045-15048.
- Roybal, K., Theobald, D., Graham, A., DiNieri, J.A., Russo, S.J., Krishnan, V., Chakravarty, S., Peevey, J., Oehrlein, N., Birnbaum, S., Vitaterna, M.H., Orsulak, P., Takahashi, J.S., Nestler, E.J., Carlezon, W.A., Jr., McClung, C.A., 2007. Mania-like behavior induced by disruption of CLOCK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 6406-6411.
- Sakane, F., Imai, S., Kai, M., Yasuda, S., Kanoh, H., 2007. Diacylglycerol kinases: why so many of them? *Biochimica et biophysica acta* 1771, 793-806.
- Salkovic-Petrisic, M., Tribl, F., Schmidt, M., Hoyer, S., Riederer, P., 2006. Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway. *Journal of neurochemistry* 96, 1005-1015.
- Sanjuan, M.A., Pradet-Balade, B., Jones, D.R., Martinez, A.C., Stone, J.C., Garcia-Sanz, J.A., Merida, I., 2003. T cell activation in vivo targets diacylglycerol kinase alpha to the membrane: a novel mechanism for Ras attenuation. *J Immunol* 170, 2877-2883.
- Schwaller, B., Tetko, I.V., Tandon, P., Silveira, D.C., Vreugdenhil, M., Henzi, T., Potier, M.C., Celio, M.R., Villa, A.E., 2004. Parvalbumin deficiency affects network properties resulting in increased susceptibility to epileptic seizures. *Molecular and cellular neurosciences* 25, 650-663.
- Scotti, M.A., Lee, G., Stevenson, S.A., Ostromecki, A.M., Wied, T.J., Kula, D.J., Gessay, G.M., Gammie, S.C., 2011. Behavioral and pharmacological assessment of a potential new mouse model for mania. *Physiology & behavior* 103, 376-383.
- Shioda, N., Yamamoto, Y., Watanabe, M., Binas, B., Owada, Y., Fukunaga, K., 2009. Heart-type fatty acid binding protein regulates dopamine D2 receptor function in mouse brain. *J Neurosci* 30, 3146-3155.
- Shirai, Y., Kouzuki, T., Kakefuda, K., Moriguchi, S., Oyagi, A., Horie, K., Morita, S.Y., Shimazawa, M., Fukunaga, K., Takeda, J., Saito, N., Hara, H., 2010. Essential role of neuron-enriched diacylglycerol kinase (DGK), DGK beta in neurite spine formation, contributing to cognitive function. *PLoS one* 5, e11602.

Siegel, A.M., 2004. Presurgical evaluation and surgical treatment of medically refractory epilepsy. *Neurosurgical review* 27, 1-18; discussion 19-21.

Stertz, L., Fries, G.R., Aguiar, B.W., Pfaffenseller, B., Valvassori, S.S., Gubert, C., Ferreira, C.L., Moretti, M., Cereser, K.M., Kauer-Sant'anna, M., Quevedo, J., Kapczinski, F., 2013. Histone deacetylase activity and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in a pharmacological model of mania. *Rev Bras Psiquiatr* 36, 39-46.

Sutton, L.P., Rushlow, W.J., 2011. The effects of neuropsychiatric drugs on glycogen synthase kinase-3 signaling. *Neuroscience* 199, 116-124.

Topham, M.K., 2006. Signaling roles of diacylglycerol kinases. *Journal of cellular biochemistry* 97, 474-484.

Topham, M.K., Prescott, S.M., 2001. Diacylglycerol kinase zeta regulates Ras activation by a novel mechanism. *The Journal of cell biology* 152, 1135-1143.

Valjent, E., Corvol, J.C., Pages, C., Besson, M.J., Maldonado, R., Caboche, J., 2000. Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *J Neurosci* 20, 8701-8709.

Valjent, E., Pascoli, V., Svenningsson, P., Paul, S., Enslen, H., Corvol, J.C., Stipanovich, A., Caboche, J., Lombroso, P.J., Nairn, A.C., Greengard, P., Herve, D., Girault, J.A., 2005. Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 491-496.

van Enkhuizen, J., Geyer, M.A., Kooistra, K., Young, J.W., 2013. Chronic valproate attenuates some, but not all, facets of mania-like behaviour in mice. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)* 16, 1021-1031.

Verebey, K., Kogan, M.J., Mule, S.J., 1981. Phencyclidine-induced stereotype in rats: effects of methadone, apomorphine, and naloxone. *Psychopharmacology* 75, 44-47.

Volkow, N.D., Wang, G.J., Fowler, J.S., Gatley, S.J., Logan, J., Ding, Y.S., Hitzemann, R., Pappas, N., 1998. Dopamine transporter occupancies in the human brain induced by therapeutic doses of oral methylphenidate. *Am J Psychiatry* 155, 1325-1331.

Wallace, H., Shorvon, S., Tallis, R., 1998. Age-specific incidence and prevalence rates of treated epilepsy in an unselected population of 2,052,922 and age-specific fertility rates of women with epilepsy. *Lancet* 352, 1970-1973.

Wang, A.Y., Lohmann, K.M., Yang, C.K., Zimmerman, E.I., Pantazopoulos, H., Herring, N., Berretta, S., Heckers, S., Konradi, C., 2011. Bipolar disorder type 1 and schizophrenia are accompanied by decreased density of parvalbumin- and somatostatin-positive interneurons in the parahippocampal region. *Acta neuropathologica* 122, 615-626.

Weber, H., Kittel-Schneider, S., Gessner, A., Domschke, K., Neuner, M., Jacob, C.P., Buttenschon, H.N., Boreatti-Hummer, A., Volkert, J., Herterich, S., Baune, B.T., Gross-Lesch, S., Kopf, J., Kreiker, S., Nguyen, T.T., Weissflog, L., Arolt, V., Mors, O., Deckert, J., Lesch, K.P., Reif, A., 2011. Cross-disorder analysis of bipolar risk genes: further evidence of DGKH as a risk gene for bipolar disorder, but also unipolar depression and adult ADHD. *Neuropsychopharmacology* 36, 2076-2085.

Willner, P., 1984. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology* 83, 1-16.

Yan, Z., Feng, J., Fienberg, A.A., Greengard, P., 1999. D(2) dopamine receptors induce mitogen-activated protein kinase and cAMP response element-binding protein phosphorylation in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 11607-11612.

Yasuda, S., Kai, M., Imai, S., Takeishi, K., Taketomi, A., Toyota, M., Kanoh, H., Sakane, F., 2009. Diacylglycerol kinase ϵ augments C-Raf activity and B-Raf/C-Raf heterodimerization. *The Journal of biological chemistry* 284, 29559-29570.

Zhang, L., Lou, D., Jiao, H., Zhang, D., Wang, X., Xia, Y., Zhang, J., Xu, M., 2004. Cocaine-induced intracellular signaling and gene expression are oppositely regulated by the dopamine D1 and D3 receptors. *J Neurosci* 24, 3344-3354.

Zhou, M., Rebholz, H., Brocia, C., Warner-Schmidt, J.L., Fienberg, A.A., Nairn, A.C., Greengard, P., Flajolet, M., 2010. Forebrain overexpression of CK1 δ leads to down-regulation of dopamine receptors and altered locomotor activity reminiscent of ADHD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 4401-4406.

Zhu, Z.Q., Armstrong, D.L., Hamilton, W.J., Grossman, R.G., 1997. Disproportionate loss of CA4 parvalbumin-immunoreactive interneurons in patients with Ammon's horn sclerosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 56, 988-998.

略語一覽表

5-HIAA	: 5-hydroxy indol-3-acetic acid
5-HT	: 5-hydroxytryptamine hydrochloride
ABC	: Avidin Biotinylated Enzyme complex
ADHD	: attention deficit hyperactive disorder
AMPA	: α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
DA	: 3,4-dihydroxyphenylethylamine
DAB	: diaminobenzidine
DAT	: dopamine transporter
DG	: diacylglycerol
DG	: dentate gyrus
DGK	: diacylglycerol kinase
DMSO	: dimethyl sulfoxide
DOPAC	: 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid
EDTA	: ethylenedinitrilotetraacetic acid
ERK	: extracellular signal-regulated kinase
GABA	: γ -aminobutyric acid
GluR1	: glutamate receptor 1
GPCR	: G-protein-coupled receptor
GSK-3	: glycogen synthase kinase-3
IP ₃	: inositol trisphosphate
IS	: internal standard
MARCKS	: myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate
MEK	: mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase
MPH	: methylphenidate
NMDA	: <i>N</i> -methyl-D-aspartate
Ola	: olanzapine
PA	: phosphatidic acid
PB	: phosphate buffer
PBS	: phosphate buffer saline
PH	: pleckstrin homology
PI ₄ P ₅ -kinase	: phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase
PIP ₂	: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKC	: protein kinase C
PLC	: phospholipase C

RasGRPs	: Ras guanyl nucleotide-releasing protein
SDS	: sodium dodecyl sulfate
TBS	: tris-buffered saline
TH	: tyrosin hydroxylase
VPA	: valproate